



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030010

(51)⁷ C12N 1/20; C02F 1/00; C05F 9/04;
C12N 1/00; B09B 3/00; C02F 11/02

(13) B

(21) 1-2017-01915

(22) 26/10/2015

(86) PCT/JP2015/080143 26/10/2015

(87) WO 2016/068093 A1 06/05/2016

(30) 2014-222126 31/10/2014 JP

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/09/2017 354A

(73) KABUSHIKI KAISHA SANYU (JP)

7-47-210, Jounan-cho, Kagoshima-shi, Kagoshima 892-0835 Japan

(72) OKAMURA, Yoshimichi (JP); YAMAMURA, Masaichi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) FRATERIBACILLUS FLAVOALBUS, PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ CHẤT THẢI
HỮU CƠ VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM THOÁI BIẾN PROTEIN

(57) Sáng chế đề cập đến *Frateribacillus flavoalbus* là loài mới của *Frateribacillus* và có các đặc tính dưới đây: 1) *Frateribacillus flavoalbus* là trực khuẩn gram âm mà hình thành bào tử; 2) *Frateribacillus flavoalbus* âm tính với oxidaza, dương tính với catalaza, và hiếu khí; và 3) *Frateribacillus flavoalbus* không sinh ra axit trong môi trường LB (độ pH 8,0) chứa 1% đường và 0,2% NaCl nếu đường là D-galactose hoặc sucrose, và sinh ra axit nếu đường là D-glucose, lactose, D-mannitol, glycerol, hoặc N-acetylglucosamine. Vi sinh vật mới này hữu ích, chẳng hạn, để xử lý các chất thải hữu cơ, như các chất bài tiết của người và lợn. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xử lý chất thải hữu cơ, phương pháp làm thoái biến protein và phương pháp sản xuất phân compost sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật mới mà là loài mới của giống *Frateribacillus*. Cụ thể, sáng chế đề cập đến *Frateribacillus flavoalbus* có các đặc tính mới.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chất thải hữu cơ thông thường được xử lý bởi quy trình đốt. Quy trình đốt gây ra các vấn đề, chẳng hạn, về khí thải sinh ra trong khi đốt các chất thải hữu cơ, và sự an toàn của địa điểm chôn lấp đối với tro do đốt gây ra. Quá trình ủ phân các chất thải hữu cơ với các vi sinh vật được đề xuất để giải quyết các vấn đề này. Sản phẩm được tạo ra bởi quy trình như vậy có thể sử dụng làm phân compôt. Do đó, quy trình ủ phân như vậy được mong đợi là làm giảm hoặc loại bỏ các vấn đề nói trên gây ra do đốt, và góp phần chứng minh có thể duy trì một xã hội theo xu thế tái chế.

Quy trình ủ phân truyền thống bao gồm làm thoái biến và đồng hóa các chất hữu cơ với vi sinh vật, như nấm (chẳng hạn, nấm mốc), xạ khuẩn (tức là, vi khuẩn thuộc bộ *Actinomycetales*), vi khuẩn thuộc họ *Thermoactinomycetaceae* bao gồm giống *Thermoactinomyces*, hoặc vi khuẩn thuộc họ *Bacillaceae* bao gồm các giống *Bacillus* và *Geobacillus*. Các vi khuẩn như vậy có khả năng tạo ra các bào tử và ở dạng bào tử ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn nhiệt độ sinh trưởng của vi sinh vật. Vi sinh vật này có tính chịu nhiệt và vẫn ổn định trong phân compôt thu được. Do đó, phân compôt được sản xuất nhờ làm thoái biến và đồng hóa các chất hữu cơ với vi sinh vật ở nhiệt độ sinh trưởng thích hợp có thể được tái sử dụng dưới dạng phân compôt thu hồi để tiếp tục ủ phân.

Quy trình ủ phân được mong muốn là bao gồm lên men hiếu khí chứ không phải là lên men kỵ khí do làm thoái biến các chất hữu cơ nhanh và làm

giảm mùi hôi. Trong quy trình ủ phân bao gồm lên men hiếu khí, nhiệt độ trong phân compôt đạt mức cao hơn 45°C trong vòng 10 ngày sau khi bắt đầu lên men bằng cách thổi khí, và mức này được giữ trong một khoảng thời gian dài cho đến khi kết thúc ủ phân. Các chất hữu cơ bị thoái biến trong phân compôt ở nhiệt độ cao (45°C đến 70°C) bởi xạ khuẩn thuộc bộ *Actinomycetales* bao gồm họ *Micromonosporaceae*, họ *Streptomycetaceae*, họ *Thermomonosporaceae*, và họ *Streptosporangiaceae*, hoặc các vi khuẩn dạng sợi ưa nhiệt thuộc họ *Thermoactinomycetaceae* (tài liệu phi sáng chế 1). Các vi khuẩn thuộc họ *Bacillaceae* bao gồm giống *Geobacillus* có trong phân compôt ở các nhiệt độ cao (các tài liệu phi sáng chế 2 và 3). Các vi khuẩn của các họ nhất định này thông thường tiến hành quy trình ủ phân trong phân compôt ở các nhiệt độ cao. Nhìn chung, các vi khuẩn kém đa dạng trong phân compôt sau khi nhiệt độ trong phân compôt đạt mức cao do các vi khuẩn thuộc các họ này có các đặc tính giống nhau.

Tài liệu sáng chế 1 mô tả phương pháp sản xuất phân compôt sử dụng chủng vi khuẩn thuộc giống *Anoxybacillus*. Tài liệu sáng chế 2 mô tả phương pháp sản xuất phân compôt sử dụng chủng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*. Mỗi phương pháp này bao gồm sử dụng vi khuẩn thuộc họ *Bacillaceae*.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số 2011-24569

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số 2008-278890

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số 2005-13063

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Journal of bioscience and bioengineering, Vol. 99, pp. 1-11, 2005

Tài liệu phi sáng chế 2: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 52, pp. 2251-2255, 2002

Tài liệu phi sáng chế 3: Systematic and Applied Microbiology, Vol. 34, pp. 419-423, 2011

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chất thải hữu cơ cần xử lý bao gồm nhiều nguồn khác nhau, như bùn hữu cơ, thức ăn thừa, và các chất bài tiết của động vật. Loại nguồn chất thải rất có ảnh hưởng đến độ pH, hàm lượng muối, hàm lượng axit humic, và tỷ lệ C/N (hàm lượng cacbon) trong phân compôt thu được. Do đó, việc ủ phân các chất thải hữu cơ khác nhau hiệu quả được mong muốn là bao gồm việc bổ sung và sự sinh trưởng của các vi khuẩn khác với các vi khuẩn sẵn có trong phân compôt, và làm thoái biến và đồng hóa các chất hữu cơ với nhiều vi khuẩn. Các vi khuẩn được bổ sung được mong muốn là có khả năng tạo ra các bào tử duy trì được tiềm lực và ổn định đối với những sự thay đổi của môi trường. Tình trạng ổn định của các bào tử là được mong đợi xét theo quan điểm dễ lưu giữ và dễ vận chuyển phân compôt và theo quan điểm kinh tế là sử dụng nhiều lần phân compôt.

Để giải quyết các vấn đề nói trên, các tác giả sáng chế đã tìm kiếm các vi khuẩn mới có giá trị để ủ phân và đã nhận thấy rằng các vi khuẩn ưa nhiệt cao thuộc giống mới sinh trưởng trong môi trường có nhiệt độ bằng 80°C hoặc cao hơn (tài liệu sáng chế 3).

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu về vi sinh vật mới để ủ phân các chất thải hữu cơ hiệu quả hơn nữa.

Mục đích của sáng chế là tạo ra vi sinh vật mới hữu ích cho, chẳng hạn, quá trình xử lý các chất thải hữu cơ như các chất bài tiết của người và bùn.

Cách thức giải quyết vấn đề

Sáng chế đã được hoàn thành nhờ sự phân lập và nhận dạng vi sinh vật mới được tìm ra bởi các tác giả sáng chế.

Sáng chế đề xuất:

Khía cạnh 1 *Frateribacillus flavoalbus* là loài mới thuộc giống *Frateribacillus* và có các đặc tính 1) đến 10) dưới đây:

- 1) *Frateribacillus flavoalbus* là trực khuẩn Gram âm mà hình thành các bào tử;
- 2) *Frateribacillus flavoalbus* âm tính với oxidaza, dương tính với catalaza, và hiếu khí;
- 3) *Frateribacillus flavoalbus* không sinh ra axit trong môi trường LB (độ pH 8,0) 1% chứa đường và 2% NaCl nếu đường là D-galactosa hoặc sucroza, và sinh ra axit nếu đường là D-glucoza, lactoza, D-manitol, glyxerin, hoặc N-axetylglucozamin;
- 4) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu là 45°C đến 55°C mà không sinh trưởng ở bằng hoặc thấp hơn 35°C hoặc bằng hoặc cao hơn 65°C;
- 5) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng ở độ pH tối ưu là 7,0 đến 8,0 mà không sinh trưởng ở độ pH bằng hoặc thấp hơn 5,7 hoặc bằng hoặc cao hơn 10,0;
- 6) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng trong môi trường CYC chứa NaCl được bổ sung ở nồng độ cuối cùng lên đến 7%;
- 7) *Frateribacillus flavoalbus* chứa MK7 dưới dạng menaquinon chủ yếu;
- 8) *Frateribacillus flavoalbus* chứa peptidoglycan của thành tế bào chứa alanin, axit glutamic, và axit mesodiaminopimelic (meso-DAP);
- 9) *Frateribacillus flavoalbus* có ADN hệ gen có hàm lượng guanin và xytosin (GC) là 51,2% đến 52,4%; và
- 10) *Frateribacillus flavoalbus* chứa iso-C16:0 dưới dạng axit béo chính của tế bào.

Khía cạnh 2 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh 1, chứa gen 16S rRNA có trình tự bazơ có độ tương đồng bằng hoặc cao hơn 98,7% với trình tự bazơ thuộc trình tự bất kỳ trong các trình tự SEQ ID: 1 và 8 đến 19.

Khía cạnh 3 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh 1 hoặc 2, có độ tương đồng để lai ADN-ADN bằng hoặc cao hơn 70% với chủng YM17: NITE

BP-01764, chủng YM17-2: NITE BP-01948, chủng YM17-3: NITE BP-01949, chủng YM17-4: NITE BP-01950, hoặc chủng YM17-5: NITE BP-01925.

Khía cạnh 4 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 3, còn chứa một hoặc nhiều axit béo của tế bào được chọn từ anteiso-C15:0, C16:0, anteiso-C17:0, và iso-C17:0.

Khía cạnh 5 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 4, bao gồm *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus* chứa axit béo của tế bào gồm iso-C16:0, anteiso-C15:0, anteiso-C17:0, và iso-C17:0.

Khía cạnh 6 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 4, bao gồm *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *finetarium* chứa axit béo của tế bào gồm có iso-C16:0, anteiso-C15:0, C16:0, và anteiso-C17:0.

Khía cạnh 7 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 6, sử dụng để xử lý chất thải hữu cơ.

Khía cạnh 8 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh 7, trong đó chất thải hữu cơ là các chất bài tiết của người, bùn hữu cơ, thức ăn thừa, hoặc các chất bài tiết của động vật.

Khía cạnh 9 *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 8, là chủng YM17 (NITE BP-01764), chủng NaCl_20131016_04, chủng YM17-2 (NITE BP-01948), chủng YM17-3 (NITE BP-01949), chủng YM17-4 (NITE BP-01950), chủng NaCl_20131016_19, chủng YM17-5 (NITE BP-01925), chủng NaCl_20131016_24, chủng NaCl_20131016_28, chủng NaCl_20131016_30, chủng NaCl_20131016_34, chủng NaCl_20131016_37, hoặc chủng NaCl_20131016_38.

Khía cạnh 10, phương pháp xử lý chất thải hữu cơ, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 9.

Khía cạnh 11, phương pháp làm thoái biến protein, trong đó phương pháp này

bao gồm bước sử dụng *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 9.

Khía cạnh 12, phương pháp sản xuất phân compôt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

trộn chất thải hữu cơ với sản phẩm được tạo ra bởi sự lên men với *Frateribacillus flavoalbus* theo khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh từ 1 đến 9 để tạo ra hỗn hợp thứ nhất;

điều chỉnh hàm lượng nước của hỗn hợp thứ nhất này;

lên men hiếu khí hỗn hợp thứ nhất để tạo ra sản phẩm lên men thứ nhất;

và

thu hồi sản phẩm lên men thứ nhất dưới dạng phân compôt nếu hàm lượng nước của sản phẩm lên men thứ nhất đáp ứng mức xác định.

Khía cạnh 13, phương pháp sản xuất phân compôt theo khía cạnh 12, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:

bổ sung phần phân compôt vào chất thải hữu cơ khác để tạo ra hỗn hợp thứ hai;

điều chỉnh hàm lượng nước của hỗn hợp thứ hai này;

lên men hiếu khí hỗn hợp thứ hai để tạo ra sản phẩm lên men thứ hai; và

thu sản phẩm lên men thứ hai dưới dạng phân compôt nếu hàm lượng nước của sản phẩm lên men thứ hai đạt được mức độ định trước.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất vi sinh vật mới là loài mới thuộc giống *Frateribacillus*. Vi sinh vật mới này hữu dụng để, ví dụ, xử lý các chất thải hữu cơ (chẳng hạn, các chất bài tiết của người và bùn) và làm thoái biến các protein. Vi sinh vật mới này còn có thể được sử dụng cho các ứng dụng khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình ảnh của các tế bào thuộc chủng YM17 (ví dụ 1).

Fig. 2 minh họa sơ đồ cây phát sinh giống loài được tạo ra bằng phương pháp kết nối liền kề (ví dụ 1).

Fig. 3 minh họa sơ đồ cây phát sinh giống loài của chủng YM17 và 12 chủng đã phân lập dựa vào gen 16S rARN (ví dụ 2).

Các Fig. 4A và 4B minh họa trạng thái của các tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong phân compôt (ví dụ 2).

Các Fig. 5A và 5B minh họa các kết quả của kỹ thuật điện di dò tìm enzym thủy phân trên gelatin (gelatin zymography) (ví dụ 2).

Fig. 6 là biểu đồ tiến trình của phương pháp sản xuất phân compôt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả với sự tham khảo các phương án sau đây, mà các phương án không gây ra sự giới hạn sáng chế.

Vi sinh vật mới

Frateribacillus flavoalbus theo một phương án của sáng chế là loài mới thuộc giống *Frateribacillus* và có các đặc tính 1) đến 10) dưới đây:

- 1) *Frateribacillus flavoalbus* là trực khuẩn Gram âm mà hình thành bào tử;
- 2) *Frateribacillus flavoalbus* âm tính với oxidaza, dương tính với catalaza, và hiếu khí;
- 3) *Frateribacillus flavoalbus* không sinh ra axit trong môi trường LB (độ pH 8,0) chứa 1% đường và 2,0% NaCl nếu đường là D-galactoza hoặc sucroza, và sinh ra axit nếu đường là D-glucoza, lactoza, D-manitol, glyxerin, hoặc N-axetylglucozamin;
- 4) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu là 45°C đến 55°C mà không sinh trưởng ở bằng hoặc thấp hơn 35°C hoặc bằng hoặc cao hơn 65°C;
- 5) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng ở độ pH tối ưu là 7,0 đến 8,0 mà không sinh trưởng ở độ pH bằng hoặc thấp hơn 5,7 hoặc bằng hoặc cao hơn 10,0;
- 6) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng trong môi trường CYC chứa NaCl

được bổ sung ở nồng độ cuối cùng lên đến 7%;

7) *Frateribacillus flavoalbus* chứa MK7 dưới dạng menaquinon chủ yếu;

8) *Frateribacillus flavoalbus* chứa peptidoglycan của thành tế bào chứa alanin, axit glutamic, và axit mesodiaminopimelic (meso-DAP);

9) *Frateribacillus flavoalbus* có ADN hệ gen có hàm lượng GC từ 51,2% đến 52,4%; và

10) *Frateribacillus flavoalbus* chứa iso-C16:0 dưới dạng axit béo chính của tế bào.

Frateribacillus flavoalbus có thể chứa "menaquinon chủ yếu" (MK7) theo lượng bằng hoặc cao hơn 81,8%.

Frateribacillus flavoalbus có thể chứa "axit béo chủ yếu của tế bào" (iso-C16:0) theo lượng là 34,1% đến 42,6%.

Frateribacillus flavoalbus, mà chứa "axit béo của tế bào" (iso-C16:0), có thể còn chứa một hoặc nhiều axit béo của tế bào được chọn từ anteiso-C15:0, C16:0, anteiso-C17:0, và iso-C17:0. *Frateribacillus flavoalbus* theo sáng chế tốt hơn nếu chứa các axit béo này theo tổng lượng bằng hoặc cao hơn 86,1%.

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế tốt hơn nếu chứa gen 16S rARN có trình tự bazơ có độ tương đồng bằng hoặc cao hơn 98,7% so với trình tự bazơ thuộc trình tự bất kỳ trong các trình tự SEQ ID NO: 1 và 8 đến 19.

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế tốt hơn nếu có độ tương đồng để lai ADN-ADN bằng hoặc cao hơn 70% với chủng YM17, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, hoặc chủng YM17-5.

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế bao gồm *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus* có các đặc tính nói trên 1) đến 10) nêu trên và chứa axit béo của tế bào gồm iso-C16:0, anteiso-C15:0, anteiso-C17:0, và iso-C17:0.

Các ví dụ về *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus* bao gồm chủng YM17 và chủng YM17-5 được mô tả dưới đây.

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế còn bao gồm *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *fimetarium* có các đặc tính 1) đến 10) nêu trên và chứa axit béo của tế bào gồm iso-C16:0, anteiso-C15:0, C16:0, và anteiso-C17:0.

Các ví dụ về *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *Fimetarium* bao gồm chủng NaCl_20131016_04, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng NaCl_20131016_19, chủng NaCl_20131016_24, chủng NaCl_20131016_28, chủng NaCl_20131016_30, chủng NaCl_20131016_34, chủng NaCl_20131016_37, và chủng NaCl_20131016_38.

Chủng YM17, là một chủng của *Frateribacillus flavoalbus* theo sáng chế, có các đặc tính nêu trên và chứa gen 16S rARN có trình tự bazơ giống 100% với trình tự bazơ của SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự.

Chủng này được lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest bởi chủ đơn với cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation-NITE). Sự lưu giữ này cụ thể là như dưới đây:

- (1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia
- (2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan (TEL: 81-438-20-5580)
- (3) Số truy cập: NITE BP-01764
- (4) Số chỉ để nhận dạng: YM17
- (5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 29 tháng 11 năm 2013

Các chủng YM17-2, YM17-3, YM17-4, và YM17-5, là các chủng của *Frateribacillus flavoalbus* theo sáng chế, còn được lưu giữ quốc tế theo hiệp ước Budapest bởi chủ đơn với cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia (NITE). Sự lưu giữ này cụ thể sẽ được mô tả dưới đây, chẳng hạn, trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế bao gồm các biến thể của các chủng tương ứng với *Frateribacillus flavoalbus*. *Frateribacillus flavoalbus* còn bao gồm các biến thể của *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus* và *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *Fimetarium*.

Các biến thể này được tạo ra nhờ cải biến các đặc tính vật lý và hóa học của *Frateribacillus flavoalbus* theo sáng chế bằng kỹ thuật di truyền, như đột biến hóa học, đột biến ngẫu nhiên, đột biến về hình thái học, hoặc chuyển nhiễm. Các biến thể này có tất cả các đặc tính 1) đến 10) nói trên.

Xử lý chất thải hữu cơ/sản xuất phân compôt

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế có thể được sử dụng để xử lý các chất thải hữu cơ, như bùn hữu cơ, thức ăn thừa, và các chất bài tiết của động vật. Phân compôt có thể được sản xuất nhờ bổ sung *Frateribacillus flavoalbus* vào chất thải hữu cơ như thế.

Phương pháp xử lý chất thải hữu cơ với *Frateribacillus flavoalbus* theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung *Frateribacillus flavoalbus* vào chất thải hữu cơ, còn có thể bao gồm các bước phụ hữu ích cho quá trình xử lý chất thải hữu cơ.

Phương pháp sản xuất phân compôt sẽ được mô tả (tức là, phương án của phương pháp xử lý chất thải hữu cơ) với sự tham khảo Fig. 6. Phương pháp theo phương án này bao gồm sự sử dụng thùng lên men lắng, nhưng có thể sử dụng phương tiện sản xuất bất kỳ khác. Thùng lên men lắng tốt hơn nếu bao gồm ba ngăn tạo thành hình chữ U khi nhìn từ trên xuống.

Bước 101 bao gồm sự tạo ra sản phẩm lên men; tức là, sản phẩm được tạo ra bởi sự lên men với *Frateribacillus flavoalbus* và chứa *Frateribacillus flavoalbus*. Bước 101 còn bao gồm tạo ra chất thải hữu cơ. Chất thải hữu cơ này được đặt vào thùng lên men lắng.

Bước 103 tiếp theo bao gồm bước trộn chất thải hữu cơ với lượng xác

định sản phẩm lên men để tạo ra hỗn hợp thứ nhất. Bước 103 hoặc các bước tiếp theo có thể sau bước 102 (bước không bắt buộc) bao gồm xác định lượng sản phẩm lên men được bổ sung vào chất thải hữu cơ và các điều kiện lên men hiếu khí thích hợp với chất thải hữu cơ dựa vào dữ liệu mong muốn từ cơ sở dữ liệu.

Bước 105 bao gồm sự điều chỉnh hàm lượng nước của hỗn hợp thứ nhất. Nhìn chung, hàm lượng nước vào khoảng 40 đến 80% tính theo tổng trọng lượng của hỗn hợp thứ nhất ngay sau khi tạo ra nó. Phân compôt thu hồi (tức là, phân compôt được thu hồi ở bước 112 mô tả dưới đây) được bổ sung vào hỗn hợp nếu hàm lượng nước vượt quá giới hạn trên, ngược lại nước được bổ sung vào hỗn hợp nếu hàm lượng nước dưới giới hạn dưới.

Bước 108 bao gồm lên men hiếu khí hỗn hợp thứ nhất, chẳng hạn, bằng cách thổi khí cưỡng bức hỗn hợp thứ nhất bằng ống dẫn khí được bố trí ở đáy của thùng lên men lắng, hoặc khuấy hỗn hợp thứ nhất với cơ cấu nạp có guồng quay, để tạo ra sản phẩm lên men thứ nhất. Hỗn hợp thứ nhất tốt hơn nếu được khuấy một tuần một lần đối với lên men hiếu khí.

Bước 110 bao gồm xác định hàm lượng nước của toàn bộ sản phẩm lên men thứ nhất có đáp ứng mức xác định hay không. Bước 105 hoặc bước 108 được lặp lại nếu hàm lượng nước không đáp ứng mức xác định. Hàm lượng nước tốt hơn nếu dưới 30% tính theo toàn bộ trọng lượng của sản phẩm lên men thứ nhất. Do đó, hàm lượng chất rắn tốt hơn nếu được điều chỉnh đến bằng hoặc cao hơn 70% tính theo toàn bộ trọng lượng của phân compôt sao cho phân compôt giữ được đặc tính của nó. Hàm lượng nước tốt hơn nữa nếu là 20 đến 30% tính theo toàn bộ trọng lượng của sản phẩm lên men thứ nhất. Sau bước 110 có thể là bước 111 (bước không bắt buộc) bao gồm tương quan giữa lượng sản phẩm lên men được bổ sung và các điều kiện lên men hiếu khí, và lưu trữ liệu tương quan trong cơ sở dữ liệu.

Bước 112 bao gồm thu hồi sản phẩm lên men thứ nhất dưới dạng phân

compôt nếu hàm lượng nước của nó đạt đến mức định trước. Toàn bộ giai đoạn lên men là khoảng 45 đến 60 ngày. Bằng cách đó phân compôt được sản xuất từ chất thải hữu cơ.

Phân compôt thu được có thể cứ thế được sử dụng. Phần phân compôt này có thể được bổ sung vào chất thải hữu cơ khác để tạo ra hỗn hợp thứ hai ở bước 203, và hỗn hợp thứ hai có thể đi qua các bước 103 đến 112 như mô tả ở trên để tiếp tục tạo ra phân compôt.

Quá trình xử lý các chất thải hữu cơ truyền thống bao gồm đốt các chất thải và chôn lấp tro thu được. Do đó, quy trình truyền thống có các vấn đề do sự thiêu đốt, như sự sinh ra khí thải và sự an toàn của địa điểm chôn lấp. Ngược lại, phương pháp theo sáng chế có thể xử lý các chất thải hữu cơ để tạo ra sản phẩm dùng làm phân bón. Do đó, phương pháp theo sáng chế làm giảm được hoặc loại bỏ các vấn đề nêu trên do sự thiêu đốt gây ra, và góp phần vào sự hình thành một xã hội có định hướng theo xu thế tái chế. Phân compôt được sản xuất bằng phương pháp này chứa rất nhiều khoáng chất.

Việc thiêu đốt phân compôt mà có hàm lượng nước thấp và có thể được đốt mà không có nhiên liệu hóa thạch sinh ra khí cacbon dioxit (CO_2) (tức là, khí nhà kính) với lượng giảm nhiều so với trường hợp của quy trình đốt truyền thống, mà đòi hỏi phải bổ sung nhiên liệu hóa thạch để thiêu đốt. Trọng lượng của phân compôt chiếm khoảng 10 đến 30% trọng lượng của chất thải hữu cơ ban đầu. Do đó, sự thiêu đốt phân compôt chỉ yêu cầu mức chi phí về nhiên liệu nhỏ và diện tích nhỏ làm địa điểm chôn lấp phân compôt đã đốt.

Quá trình xử lý chất thải hữu cơ (sản xuất phân compôt) bằng vi sinh vật truyền thống đòi hỏi sự điều chỉnh chính xác các điều kiện lên men phụ thuộc vào nguồn chất thải do loại nguồn chất thải ảnh hưởng lớn đến độ pH, hàm lượng muối, hàm lượng axit humic, và tỷ lệ C/N ở phân compôt thu được. Ngược lại, quy trình xử lý với vi sinh vật mới không đòi hỏi sự điều chỉnh chính

xác các điều kiện lên men, nhờ đó đơn giản hóa hoặc bỏ qua bước 102 hoặc 111 được minh họa ở Fig. 6.

Quy trình xử lý có thể sử dụng phân compôt thu hồi chứa nhiều vi khuẩn hữu hiệu cho quá trình ủ phân, làm cho sự ủ phân ban đầu diễn ra nhanh sau khi trộn nguồn chất thải với phân compôt thu hồi ở bước 103. Quy trình xử lý này bao gồm phương tiện phụ trợ đơn giản, nhờ đó giảm được chi phí về phương tiện và giảm chi phí vận hành.

Các phương án khác

Frateribacillus flavoalbus theo sáng chế còn có thể được sử dụng để làm thoái biến protein. Phương pháp làm thoái biến protein với *Frateribacillus flavoalbus* có thể bao gồm bước bổ sung *Frateribacillus flavoalbus* vào protein hoặc đối tượng chứa protein, và bước phụ hữu ích cho sự thoái biến protein.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nhờ các ví dụ thực hiện sáng chế, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phân lập và nhận dạng *Frateribacillus flavoalbus*

1. Phân lập chủng

Chủng YM17 được phân lập từ phân compôt thu được từ địa điểm ủ phân ở thành phố Soo (Kagoshima, Nhật Bản).

Cụ thể, phân compôt (400mg) được bổ sung vào 1/2 môi trường dinh dưỡng (pepton: 0,25%, natri clorua: 0,25%, cao nấm men: 0,1%, chất chiết thịt: 0,05%, độ pH 7,4) (4ml) chứa novobioxin 50 µg/ml và được nuôi cấy ở 55°C trong hai ngày. Môi trường lỏng thu được được dùng cho 1/2 môi trường thạch dinh dưỡng chứa novobioxin 50 µg/ml và được nuôi cấy trong bốn ngày, để phân lập khuẩn lạc của chủng YM17.

2. Các đặc tính phân loại

A. Các phương pháp thử nghiệm

Các đặc tính phân loại của chủng này được phân tích theo các phương pháp được mô tả trong "*Shin Seikagaku Jikken Koza* (New Biochemical Experimental Course) Vol. 17, *Biseibutsu Jikkenho* (Microbial Experiment), do Tokyo Kagaku Dojin xuất bản", "*Kaiteiban Biseibutsu no Bunrui to Dotei* (Classification and Identification of Microorganisms, revised edition) Vol. 2, published by Gakkai Shuppan Center", "*Biseibutsu no Bunrui Dotei Jikkenho* (Experimental Classification and Identification of Microorganisms), do Springer Japan xuất bản" và "BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology." Chủng đã phân lập được phân loại và được nhận dạng bằng cách so sánh với loài được mô tả trong tạp chí quốc tế vi sinh vật học hệ thống và tiến hóa (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology).

Các bảng 2-1 và 2-5 minh họa các đặc tính về hình thái, nuôi cấy, và sinh lý, phạm vi sinh trưởng, và các đặc tính phân loại bằng hóa học được xác định bởi phép phân tích nói trên. Fig. 1 là ảnh của các tế bào của chủng YM17 được nuôi cấy ở 55°C. Như được minh họa ở Fig. 1, chủng YM17 là trực khuẩn và tạo ra các bào tử ở đuôi tế bào. Vạch ở Fig. 1 tương ứng với 10µm. Bảng 2 (các bảng 2-1 đến 2-5) còn minh họa cho các đặc tính phân loại của 12 chủng được phân lập ở ví dụ 2.

B. Các môi trường thử nghiệm

Các trị số pH của môi trường được minh họa ở bảng 2-1. Các môi trường ngoại trừ sữa quỳ được khử trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 15 phút. Sữa quỳ được khử trùng trong nồi hấp ở 110°C trong 10 phút. Ure cho môi trường ure Christensen, đường cho môi trường thử nghiệm OF, và các đường được thử nghiệm về sự sinh axit từ các đường này được khử trùng với bộ lọc, rồi sau đó được bổ sung vào các môi trường tương ứng để đạt được nồng độ cuối được mô tả dưới đây. Sự sinh axit từ các đường được đánh giá trong môi trường LB (độ

pH 8,0) chứa 1% đường và 2% NaCl.

(1) Môi trường thạch CYC (sucroza: 3%, axit casamino: 0,6%, natri nitrat: 0,3%, cao nấm men: 0,2%, dikali hydrophosphat: 0,1%, magie sulfat heptahydrat: 0,05%, kali clorua: 0,05%, sắt sulfat heptahydrat: 0,001%, thạch: 1,5%)

(2) Môi trường lỏng CYC (sucroza: 3%, axit casamino: 0,6%, natri nitrat: 0,3%, cao nấm men: 0,2%, dikali hydrophosphat: 0,1%, magie sulfat heptahydrat: 0,05%, kali clorua: 0,05%, sắt sulfat heptahydrat: 0,001%)

(3) Môi trường thạch nước thịt (chất chiết thịt: 1%, pepton: 1%, natri clorua: 0,5%, thạch: 1,5%)

(4) Môi trường lỏng nước thịt (chất chiết thịt: 1%, pepton: 1%, natri clorua: 0,5%)

(5) Sữa quỳ (sữa không kem: 10%, 1% chất lỏng quỳ: vài giọt)

(6) Môi trường VP (cao nấm men: 0,1%, tripton: 0,7%, soyton: 0,5%, glucoza: 1%, natri clorua: 0,5%, thạch: 0,3%)

(7) Môi trường SIM (chất chiết thịt: 0,3%, pepton: 3%, natri thiosulfat: 0,005%, xystein hydroclorua: 0,02%, amoni sắt xitrat: 0,05 g, thạch: 0,5%)

(8) Môi trường thạch LB (tripton: 1%, natri clorua: 0,5%, cao nấm men: 0,5%, thạch: 1,5%)

(9) Môi trường thạch SY (amoni sulfat: 0,2%, dinatri hydrophosphat: 0,14%, kali dihydrophosphat: 0,07%, magie sulfat heptahydrat: 0,02%, sắt sulfat heptahydrat: 0,0005%, mangan sulfat pentahydrat: 0,0005%, glucoza: 1%)

(10) Môi trường thạch dinh dưỡng (chất chiết thịt: 0,3%, pepton: 0,5%, thạch: 1,5%)

(11) Môi trường Simmons (amoni dihydrophosphat: 0,1%, dikali hydrophosphat: 0,1%, natri clorua: 0,5%, natri xitrat: 0,2%, magie sulfat heptahydrat: 0,02%, thạch: 1,5%, BTB: 0,008%)

(12) Môi trường Christensen (cao nấm men: 0,05%, xystein hydroclorua: 0,01%,

natri clorua: 0,5%, natri xitrat: 0,3%, glucoza: 0,02%, kali dihydrophosphat: 0,1%, thạch: 1,5%, phẩm đỏ phenol: 0,0012%)

(13) Môi trường nitrat (glucoza: 1,0%, kali dihydrophosphat: 0,1%, magie sulfat heptahydrat: 0,05%, kali clorua: 0,02%, natri nitrat: 0,1%)

(14) Môi trường muối amoni (glucoza: 1,0%, kali dihydrophosphat: 0,1%, magie sulfat heptahydrat: 0,05%, kali clorua: 0,02%, amoni sulfat: 0,078%)

(15) Môi trường ure Christensen (pepton: 0,1%, natri clorua: 0,5%, glucoza: 0,1 g, KH_2PO_4 : 0,2%, phẩm đỏ phenol: 0,0008%, thạch: 1,5%, ure: 2%)

(16) Môi trường thử nghiệm OF (pepton: 0,2%, natri clorua: 0,5%, dikali hydrophosphat: 0,03%, thạch: 0,2%, BTB: 0,008%, đường: 1%)

C. Phân tích axit béo

1) Chuẩn bị mẫu và sắc ký khí

Môi trường CYC lỏng (3 L) được đặt vào bình nón có dung tích 5 L, và chủng được nuôi cấy làm giống được cấy vào môi trường. Chủng này được nuôi cấy ở 52°C từ cuối pha sinh trưởng logarit đến đầu pha tĩnh, và các tế bào vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm.

Các tế bào đã thu hoạch được rửa hai lần với nước muối. Các tế bào ướt (khoảng 500mg đến 700mg) được đặt trong ống ly tâm có trang bị nắp vặn, và chất xà phòng hóa kiềm (1ml) được bổ sung vào các tế bào. Ống ly tâm được hàn kín và được giữ ở 100°C trong năm phút. Sau đó, ống ly tâm được lắc kỹ trong 10 giây rồi sau đó được giữ ở 100°C trong 30 phút. Ống ly tâm được làm mát, rồi sau đó thuốc thử axit clohydric-metanol (2ml) được bổ sung vào ống này. Ống ly tâm được hàn kín và được giữ ở 80°C trong 10 phút. Ống ly tâm được làm mát, rồi sau đó dung môi để chiết (1,25ml) được bổ sung vào ống. Hỗn hợp thu được được khuấy từ từ trong 10 phút. Ống được ly tâm ở 1000 vòng/phút trong năm phút. Sau đó, lớp trên được chuyển sang một ống ly tâm khác có trang bị nắp vặn, và dung dịch để rửa (3ml) được bổ sung vào ống này.

Ống ly tâm được hàn kín và được khuấy trong năm phút. Ống này được ly tâm ở 1000 vòng/phút trong năm phút, rồi sau đó lớp dung môi được chuyển sang ống thủy tinh, tiếp theo được làm khô với khí nitơ. Hợp phần chứa các thuốc thử được mô tả dưới đây. Mẫu khô thu được được phân tích về các axit béo bằng phép sắc ký khí trong phòng thí nghiệm Techno Suruga Lab. Các kết quả được minh họa ở bảng 1.

2) Các thuốc thử

(1) Chất xà phòng hóa kiềm (natri hydroxit: 7,5g, metanol: 25ml, nước siêu tinh khiết: 25ml)

(2) Thuốc thử axit clohydric-metanol (axit clohydric 6N: 21,7ml, metanol: 18,3ml)

(3) Dung môi để chiết (hexan: 10ml, t-butyl metyl ete: 10ml)

(4) Dung dịch để rửa (natri hydroxit: 0,586g, nước siêu tinh khiết: 48,8ml)

Bảng 1

Tỷ lệ axit béo của tế bào của <i>Frateribacillus flavoalbus</i>	
Loại axit béo	Tỷ lệ (%)
C10:0	0,10
anteiso C11:0	0,17
iso C12:0	0,07
C12:0	0,33
anteiso C13:0	0,11
iso C14:0	1,59
C14:0	0,43
iso C15:0	6,79
anteiso C15:0	16,59
C15:0	----
iso C16:0	37,92
C16:1 ω 7c và C16:1 ω 6c	1,66
C16:0	6,69
iso C17:0	8,89
anteiso C17:0	16,48
C17:0	0,35
C18:3 ω 6c (6,9,12)	0,26
iso C18:0	1,00
C18:1 ω 9c	0,28
C18:0	0,30

D. Peptidoglycan của thành tế bào

1) Chuẩn bị mẫu

Các tế bào vi khuẩn ướt (khoảng 2g) được tạo huyền phù trong đệm phosphat 50mM (độ pH 7,2) (6ml), và huyền phù được xử lý với máy đồng nhất hóa bằng siêu âm (VP-30S, do TAITTEC sản xuất) trong 30 phút để phá vỡ tế bào. Dịch đồng nhất thu được được ly tâm ở 4°C và 3000 vòng/phút trong 10 phút, rồi sau đó phần nổi ở trên bề mặt được thu hồi. Phần nổi ở trên bề mặt được ly tâm ở 4°C và 9000 vòng/phút trong 60 phút. Phần nổi ở trên bề mặt thu được được loại bỏ, và chất kết tủa được chuyển sang một ống ly tâm khác. Chất kết tủa được rửa với dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,2) (6ml) rồi sau đó được ly tâm ở 4°C và 9000 vòng/phút trong 60 phút, tiếp theo loại bỏ phần nổi ở trên bề mặt. Chất kết tủa thu được được trộn với dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,2) (2ml) và natri dodecyl sulfat 25% (SDS) (400μl), và hỗn hợp được giữ ở 100°C trong 40 phút. Dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,2) (10ml) đã gia nhiệt đến 65°C được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy rồi sau đó được ly tâm ở 30°C và 9000 vòng/phút trong 60 phút.

Phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ, và chất kết tủa được rửa với dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,2) (5ml) đã gia nhiệt đến 65°C. Hỗn hợp này được ly tâm ở 30°C và 9000 vòng/phút trong 30 phút, và phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ. Thao tác rửa được tiến hành hai lần. Sau đó, chất kết tủa được trộn với dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,6) (2ml) và dung dịch Pronaza 1mg/ml (100μl), và hỗn hợp này được giữ ở 37°C trong hai giờ. Sau phản ứng Pronaza, dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,6) (5ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng để rửa thành phần của thành tế bào. Hỗn hợp thu được được ly tâm ở 4°C và 9000 vòng/phút trong 30 phút, và phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ. Thao tác rửa được tiến hành hai lần.

Sau đó, dung dịch axit tricloaxetic trong nước 5% (2ml) được bổ sung

vào chất kết tủa, và hỗn hợp này được giữ ở 100°C trong 20 phút. Huyền phù thu được được chuyển sang ống ly tâm thủy tinh, và dung dịch đệm phosphat 50mM (độ pH 7,2) (5ml) được bổ sung vào ống để rửa. Sau đó hỗn hợp này được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng và 1000 vòng/phút trong một phút, và phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ. Thao tác rửa được tiến hành hai lần. Sau đó, etanol (3ml) được bổ sung vào chất kết tủa, và hỗn hợp này được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng và 1000 vòng/phút trong một phút. Phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ, và diethyl ete (3ml) được bổ sung vào chất kết tủa. Hỗn hợp này được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng và 1000 vòng/phút trong một phút, và phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ. Chất kết tủa được làm khô để tạo ra mẫu chứa thành tế bào.

2) Phép sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography-TLC)

Axit clohydric 4N (250μl) được bổ sung vào mẫu chứa thành tế bào (5mg), và hỗn hợp này được thủy phân ở 100°C trong 16 giờ. Sau khi thủy phân, axit clohydric được loại bỏ trong bình làm khô chứa kali hydroxit, và hỗn hợp thu được được trải qua quá trình TLC.

Tấm TLC được sử dụng là tấm TLC xenluloza (Cat. No. 1.05716.0001, do Merck sản xuất). Để phát hiện các axit amin cấu tạo, dung môi hiện hình chứa 2-propanol, axit axetic, và nước siêu tinh khiết (75:10:15) được sử dụng để hiện màu chiều thứ nhất, và dung môi hiện hình chứa metanol, pyridin, axit clohydric 10N, và nước siêu tinh khiết (64:8:2:14) được sử dụng để hiện màu chiều thứ hai. Sau khi hiện màu, thuốc thử ninhydrin được xịt lên tấm TLC để phát hiện các axit amin có trong peptidoglycan của thành tế bào. Dạng đồng phân của axit diaminopimelic được nhận dạng bằng cách so sánh độ linh động với các tiêu chuẩn của axit diaminopimelic nhờ sử dụng cùng một tấm TLC nhờ hiện màu với hỗn hợp chứa metanol, pyridin, axit clohydric 10N, và nước siêu tinh khiết (64:8:2:14). Peptidoglycan của thành tế bào được xác định là chứa các

axit amin sau đây: alanin, axit glutamic, và axit mesodiaminopimelic (meso-DAP).

E. Menaquinon

1) Chuẩn bị mẫu

Hỗn hợp chứa cloroform và metanol (2:1) (20ml) được bổ sung vào các tế bào vi khuẩn khô (khoảng 500mg), và hỗn hợp thu được được khuấy từ từ ở nơi râm mát qua đêm. Huyền phù thu được được đưa đi lọc, và chất lọc được cô đến khô với thiết bị làm bay hơi kiểu quay trong bể nước ở 30°C. Sản phẩm khô được hòa tan trong axeton (3ml) và được cô đến khoảng 200µl với khí nitơ. Dung dịch đã cô được phủ lên tấm silicagel HPTLC 60F254 (Cat. No. 1.05628.0001, do Merck sản xuất) và được hiện màu với toluen. Sau khi hiện màu, tấm TLC được làm khô, và dải menaquinon được xác định bằng đèn tử ngoại (254nm). Silicagel ở băng menaquinon được nạo bằng dao trộn và được đặt vào ống thử nghiệm. Axeton (4ml) được bổ sung vào silicagel, và hỗn hợp này được khuấy từ từ và được đưa đi lọc để loại bỏ các hạt silicagel. Chất lọc thu được được cô đến khoảng 200µl với khí nitơ để tạo ra mẫu HPLC.

2) Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High-performance liquid chromatography-HPLC)

Mẫu (25µl) được tiêm vào HPLC. Cột được sử dụng là cột ODS (CAPCELL PAK C18 UG120 HPLC PACKED COLUMN Cat. No. 61504, do Shiseido Company, Limited sản xuất). Phép phân tích HPLC được tiến hành với hệ thống HPLC số 1100 (Series 1100 HPLC System) (do Hewlett-Packard Company sản xuất) (dung môi hiện hình: hỗn hợp chứa metanol và 2-propanol (2:1), tốc độ chảy: 1,5 ml/phút, nhiệt độ của cột: 40°C, phát hiện: UV (270nm)). Phép phân tích được tiến hành một số lần. Hàm lượng MK7 được xác định là 83,9% (phân tích lần đầu) và 85,2% (phân tích lần thứ hai). Các kết quả đã chứng minh được là menaquinon chủ yếu là MK7.

F. Hàm lượng GC

1) Chuẩn bị ADN

ADN hệ gen được chiết theo phương pháp được mô tả trong tài liệu tham khảo 1.

Nói một cách chi tiết, các tế bào vi khuẩn ướ́t (0,9g đến 1,6g) được rửa với dung dịch nước muối-EDTA 0,1M (độ pH 8,0) rồi sau đó được tạo huyền phù trong dung dịch nước muối-EDTA 0,1M (độ pH 8,0) (5ml). Lysozym trong lòng trắng trứng (nồng độ cuối: 1 mg/ml) được bổ sung vào huyền phù và được đưa đi khuấy phân ở 35°C, rồi sau đó dịch thủy phân thu được được làm đông lạnh. Dịch thủy phân đông lạnh được trộn với lượng tương đương trishydroxymethylaminometan (Tris)-SDS (độ pH 9,0), và hỗn hợp này được làm nóng chảy trong bể nước nóng ở 60°C trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp này được làm mát trong đá và được trộn với lượng tương đương phenol bão hòa trong nước, và hỗn hợp này được lắc trong 10 phút. Hỗn hợp được ly tâm, và phần nổi ở trên bề mặt được thu hồi. Phần nổi ở trên bề mặt được trộn với lượng etanol gấp đôi, và sợi ADN được gom bằng đũa thủy tinh. ADN thu được được rửa lần lượt với 70% etanol, 90% etanol, và 99,5% etanol để loại phenol. ADN thu được được làm khô rồi sau đó được hòa tan ở lượng thích hợp của dung dịch SSC 0,1×. RNaza được bổ sung vào dung dịch, và phản ứng xảy ra ở nhiệt độ 35°C trong 30 phút hoặc lâu hơn để loại ARN. Sản phẩm thu được được làm mát trong đá và được trộn với 1/5 lượng phenol bão hòa trong nước. Hỗn hợp được đưa đi lắc, ly tâm, kết tủa etanol, loại bỏ phenol, hòa tan trong dung dịch SSC 0,1×, và xử lý RNaza theo phương pháp tương tự như mô tả ở trên.

ADN đã xử lý RNaza được xử lý với phenol và được ly tâm để tách mảnh có chứa ADN. Mảnh có chứa ADN được trộn với 1/10 lượng axit axetic-EDTA và 0,6 lần lượng 2-propanol, tiếp theo gom ADN. ADN gom được được rửa với 70% etanol, 90% etanol, và 99,5% etanol rồi sau đó được làm khô. ADN đã làm khô được hòa tan trong dung dịch SSC 0,1× để đạt được nồng độ

ADN là 500 µg/ml hoặc lớn hơn. Nếu độ tinh khiết của ADN là thấp, quá trình loại bỏ các protein bằng phenol và quá trình xử lý RNaza được lặp lại.

Tài liệu tham khảo 1: Saito, H. & Miura, K. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 72: 619-629.

2) Thuốc thử

(1) Nước muối-EDTA 0,1M (NaCl: 8,77g, EDTA·2Na·2H₂O: 37,22g, độ pH: 8,0, nước siêu tinh khiết: được bổ sung để đạt được tổng thể tích 1000ml).

(2) Tris-SDS (Tris: 12,1g, SDS: 20,0g, độ pH 9,0, nước siêu tinh khiết: được bổ sung để đạt được tổng thể tích 1000ml).

(3) SSC 20× (NaCl: 175g, trinati xitrat: 77,4g, nước siêu tinh khiết: được bổ sung để đạt được tổng thể tích là 1000ml, SSC 0,1× và SSC 1× được chuẩn bị bằng cách pha loãng SSC 20× với nước siêu tinh khiết).

(4) Axit axetic-EDTA (dung dịch A: CH₃COONa·3H₂O (81,65g)/nước siêu tinh khiết (200ml), dung dịch B: CH₃COOH (36,03g)/nước siêu tinh khiết (200ml), dung dịch A được trộn với dung dịch B (độ pH của hỗn hợp A-B: được điều chỉnh đến 7,0), axit axetic-EDTA: EDTA·2Na·2H₂O (74,45mg)/hỗn hợp A-B (200ml)).

3) Xác định hàm lượng GC

Hàm lượng GC được xác định với kit DNA GC (Yamasa Corporation). ADN (7µg) được hòa tan trong SSC 0,1× (20µl) và bị làm biến tính bằng nhiệt ở 100°C trong 10 phút, tiếp theo là tôi với băng. Dung dịch nucleaza P1 4U/ml (20µl) được bổ sung vào dung dịch ADN đã làm mát trong đá, và phản ứng xảy ra ở 50°C trong một giờ. Dung dịch phosphataza kiềm 2,4U/ml (20µl) được bổ sung vào dung dịch đã xử lý nucleaza P1, và phản ứng được phép diễn ra ở 37°C trong một giờ. Sản phẩm thu được được đưa đi HPLC.

Cột HPLC được sử dụng là cột ODS (CAPCELL PAK C18 UG120

HPLC PACKED COLUMN Cat. No. 61504, do Shiseido Company, Limited sản xuất) (dung môi hiện hình: hỗn hợp chứa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,02M và axetonitril (20:1), tốc độ chảy: 1,0ml/phút, nhiệt độ của cột: 40°C, phát hiện: UV (270nm)). Hàm lượng GC của chủng YM17 được xác định là 51,4% dựa vào tiêu chuẩn có trong kit DNA GC.

Bảng 2-1

Kết quả phân tích phân loại *Frateribacillus flavoalbus*

Nội dung			YM 17	YM 17-5	NaCl_20131016_04
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)	Dạng tế bào	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
		Tính đa hình	Không	Không	Không
		Hình thành bào tử	Có	Có	Có
		Vị trí bào tử	Đuôi	Đuôi	Đuôi
		Khả năng di động	-	-	-
		Màu sắc khuẩn lạc	Kem	Trắng ngà	Trắng xám
Đặc điểm sinh lý	Nhuộm gram		Ấm tính	Ấm tính	Ấm tính
	Khử nitrat (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Loại nitơ (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Khả năng làm thoái biến				
	Gelatin (môi trường thạch CYC, độ pH 8,0, gelatin 2%)		+	+	+
	Xenluloza (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xenluloza 0,4%)		-	-	-
	Tributyrin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tributyrin 0,4%)		-	-	-
	Chitin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, chitin 0,4%)		-	-	-
	Xantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xantin 0,4%)		-	-	-
	Hypoxantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, hypoxantin 0,4%)		-	-	-
	Tyrosin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tyrosin 0,4%)		-	-	-
	Sinh trưởng trong môi trường				
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)		+	+	+
	Môi trường thạch LB (độ pH 7,0)		+	+	+
	Môi trường thạch SY (độ pH 7,0)		-	-	-
	Môi trường thạch dinh dưỡng (độ pH 7,0)		-	-	-
	Sinh màu (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Oxidaza		-	-	-
	Catalaza		+	+	+
	Hoạt động với oxy		Hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí
	Sinh axit từ đường (môi trường LB; độ pH 8,0, NaCl 2%, đường 1%)				
	D-glucosa		+	+	+
	D-Manosa		-	-	-
	D-Galactosa		-	-	-
	Maltoza		-	-	-
	Sucroza		-	-	-
	Lactosa		+	+	+
	Trehaloza		-	-	+
	D-Sorbitol		+	+	-
	D-Manitol		+	+	+
	Inositol		-	-	+
	Glycerin		+	+	+
	N-acetylglucosamin		+	+	+
Phạm vi sinh trưởng	Nhiệt độ sinh trưởng (môi trường CYC, độ pH 7,0)				
	20		-	-	-
	30		-	-	-
	35		-	-	-
	40		+	+	+
	45		+	+	+
	55		+	+	+
	65		-	-	-
	Độ pH sinh trưởng (môi trường CYC)				
	5,7		-	-	-
	6,8		+	+	+
	7,0		+	+	+
	8,0		+	+	+
	9,0		+	+	+
	10,0		-	-	-
	10,7		-	-	-
	Nồng độ NaCl sinh trưởng (môi trường CYC, độ pH 7,0)				
	0,0%		+	+	+
	2,0%		+	+	+
	4,0%		+	+	+
	7,0%		+	+	+
	10,0%		-	+	+
	20,0%		-	-	-

* Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ nuôi cấy là 55°C (trừ các thử nghiệm về nhiệt độ sinh trưởng và đặc tính phân loại)

Bảng 2-2

Kết quả phân tích phân loại *Frateribacillus flavoalbus*

Nội dung			NaCl 20131016 19	YM 17-2	YM17-3	YM17-4
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)	Dạng tế bào	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
		Tính đa hình	Không	Không	Không	Không
		Hình thành bào tử	Có	Có	Có	Có
		Vị trí bào tử	Đuôi	Đuôi	Đuôi	Đuôi
		Khả năng di động	-	-	-	-
		Màu sắc khuẩn lạc	Trắng xám	Trắng xám	Trắng xám	Trắng xám
Đặc điểm sinh lý	Nhuộm gram		Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
	Khử nitrat (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0)		-	-	-	-
	Loại nitơ (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0)		-	-	-	-
	Khả năng làm thoái biến					
	Gelatin (môi trường thạch CYC, độ pH 8,0, gelatin 2,0%)		+	+	+	+
	Xenluloza (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xenluloza 0,4%)		-	-	-	-
	Tributylin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tributylin 0,4%)		-	-	-	-
	Chitin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, chitin 0,4%)		-	-	-	-
	Xantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xantin 0,4%)		-	-	-	-
	Hypoxantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, hypoxantin 0,4%)		-	-	-	-
	Tyrosin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tyrosin 0,4%)		-	-	-	-
	Sinh trưởng trong môi trường					
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)		+	+	+	+
	Môi trường thạch LB (độ pH 7,0)		+	+	+	+
	Môi trường thạch SY (độ pH 7,0)		-	-	-	-
	Môi trường thạch dinh dưỡng (độ pH 7,0)		-	-	-	-
	Sinh màu (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0)		-	-	-	-
	Oxidaza		-	-	-	-
	Catalaza		+	+	+	+
	Hoạt động với oxy		Hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí
	Sinh axit từ đường (môi trường LB; độ pH 8,0, NaCl 2%, đường 1%)					
	D-glucosa		+	+	+	+
	D-Manoza		-	+	-	-
	D-Galactosa		-	-	-	-
	Maltoza		-	-	-	+
	Sucroza		-	-	-	-
	Lactoza		+	+	+	+
	Trehaloza		+	+	+	+
	D-Sorbitol		-	+	+	+
	D-Manitol		+	+	+	+
	Inositol		-	-	-	-
	Glyxerin		+	+	+	+
	N-axetylglucozamin		+	+	+	+
Phạm vi sinh trưởng	Nhiệt độ sinh trưởng (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0)					
	20		-	-	-	-
	30		-	-	-	-
	35		-	-	-	-
	40		+	+	+	+
	45		+	+	+	+
	55		+	+	+	+
	65		-	-	-	-
	Độ pH sinh trưởng (môi trường thạch CYC)					
	5,7		-	-	-	-
	6,8		+	+	+	+
	7,0		+	+	+	+
	8,0		+	+	+	+
	9,0		+	+	+	+
	10,0		-	-	-	-
	10,7		-	-	-	-
	Nồng độ NaCl sinh trưởng (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0)					
	0,0%		+	+	+	+
	2,0%		+	+	+	+
	4,0%		+	+	+	+
	7,0%		+	+	+	+
	10,0%		+	+	+	+
	20,0%		-	-	-	-

* Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ nuôi cấy là 55°C (trừ các thử nghiệm về nhiệt độ sinh trưởng và đặc tính phân loại)

Bảng 2-3

Kết quả phân tích phân loại *Frateribacillus flavoalbus*

Nội dung			NaCl_20131016_24	NaCl_20131016_28	NaCl_20131016_30
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)	Dạng tế bào	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
		Tính đa hình	Không	Không	Không
		Hình thành bào tử	Có	Có	Có
		Vị trí bào tử	Đuôi	Đuôi	Đuôi
		Khả năng di động	-	-	-
		Màu sắc khuẩn lạc	Trắng xám	Trắng xám	Trắng xám
Đặc điểm sinh lý	Nhuộm gram		Âm tính	Âm tính	Âm tính
	Khử nitrat (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Loại nitơ (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Khả năng làm thoái biến				
	Gelatin (môi trường thạch CYC, độ pH 8,0, gelatin 2%)		+	+	+
	Xenululoza (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xenululoza 0,4%)		-	-	-
	Tributyrin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tributyrin 0,4%)		-	-	-
	Chitin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, chitin 0,4%)		-	-	-
	Xantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xantin 0,4%)		-	-	-
	Hypoxantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, hypoxantin 0,4%)		-	-	-
	Tyrosin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tyrosin 0,4%)		-	-	-
	Sinh trưởng trong môi trường				
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)		+	+	+
	Môi trường thạch LB (độ pH 7,0)		+	+	+
	Môi trường thạch SY (độ pH 7,0)		-	-	-
	Môi trường thạch dinh dưỡng (độ pH 7,0)		-	-	-
	Sinh màu (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Oxidaza		-	-	-
	Catalaza		+	+	+
	Hoạt động với oxy		Hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí
	Sinh axit từ đường (môi trường LB; pH 8,0, NaCl 2%, đường 1%)				
	D-glucosa		+	+	+
	D-Manosa		-	+	+
	D-Galactosa		-	-	-
	Maltoza		-	-	-
	Sucroza		-	-	-
	Lactosa		+	+	+
	Trehaloza		-	-	+
	D-Sorbitol		+	+	+
	D-Manitol		+	+	+
	Inositol		-	-	-
	Glyxerin		+	+	+
	N-axetylglucozamin		+	+	+
Phạm vi sinh trưởng	Nhiệt độ sinh trưởng (môi trường CYC, độ pH 7,0)				
	20		-	-	-
	30		-	-	-
	35		-	-	-
	40		+	+	+
	45		+	+	+
	55		+	+	+
	65		-	-	-
	Độ pH sinh trưởng (môi trường CYC)				
	5,7		-	-	-
	6,8		+	+	+
	7,0		+	+	+
	8,0		+	+	+
	9,0		+	+	+
	10,0		-	-	-
	10,7		-	-	-
	Nồng độ NaCl sinh trưởng (môi trường CYC, độ pH 7,0)				
	0,0%		+	+	+
	2,0%		+	+	+
	4,0%		+	+	+
	7,0%		+	+	+
	10,0%		+	+	+
	20,0%		-	-	-

* Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ nuôi cấy là 55°C (trừ các thử nghiệm về nhiệt độ sinh trưởng và đặc tính phân loại)

Bảng 2-4

Kết quả phân tích phân loại *Frateribacillus Flavofaibus*

Nội dung			NaCl_20131016_34	NaCl_20131016_37	NaCl_20131016_38
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)	Dạng tế bào	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
		Tính đa hình	Không	Không	Không
		Hình thành bào tử	Có	Có	Có
		Vị trí bào tử	Đuôi	Đuôi	Đuôi
		Khả năng di động	-	-	-
		Màu sắc khuẩn lạc	Trắng xám	Trắng xám	Trắng xám
Đặc điểm sinh lý	Nhuộm gram		Âm tính	Âm tính	Âm tính
	Khử nitrat (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Loại nitơ (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Khả năng làm thoái biến				
	Gelatin (môi trường thạch CYC, độ pH 8,0, gelatin 2%)		+	+	+
	Xenluloza (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xenluloza 0,4%)		-	-	-
	Tributyrin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tributyrin 0,4%)		-	-	-
	Chitin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, chitin 0,4%)		-	-	-
	Xantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, xantin 0,4%)		-	-	-
	Hypoxantin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, hypoxantin 0,4%)		-	-	-
	Tyrosin (môi trường thạch CYC, độ pH 7,0, tyrosin 0,4%)		-	-	-
	Sinh trưởng trong môi trường				
	Môi trường thạch CYC (độ pH 7,0)		+	+	+
	Môi trường thạch LB (độ pH 7,0)		+	+	+
	Môi trường thạch SY (độ pH 7,0)		-	-	-
	Môi trường thạch dinh dưỡng (độ pH 7,0)		-	-	-
	Sinh màu (môi trường CYC, độ pH 7,0)		-	-	-
	Oxidaza		-	-	-
	Catalaza		+	+	+
	Hoạt động với oxy		Hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí
	Sinh axit từ đường (môi trường LB; độ pH 8,0, NaCl 2%, đường 1%)				
	D-glucosa		+	+	+
	D-Manosa		-	-	-
	D-Galactosa		-	-	-
	Maltoza		-	-	-
	Sucroza		-	-	-
	Lactoza		+	+	+
	Trehaloza		+	+	+
	D-Sorbitol		-	-	-
	D-Manitol		+	+	+
	Inositol		-	-	-
	Glyxerin		+	+	+
	N-axetylglucozamin		+	+	+
Phạm vi sinh trưởng	Nhiệt độ sinh trưởng (môi trường CYC, độ pH 7,0)				
	20		-	-	-
	30		-	-	-
	35		-	-	-
	40		+	+	+
	45		+	+	+
	55		+	+	+
	65		-	-	-
	Độ pH sinh trưởng (môi trường CYC)				
	5,7		-	-	-
	6,8		+	+	+
	7,0		+	+	+
	8,0		+	+	+
	9,0		+	+	+
	10,0		-	-	-
	10,7		-	-	-
	Nồng độ NaCl sinh trưởng (môi trường CYC, độ pH 7,0)				
	0,0%		+	+	+
	2,0%		+	+	+
	4,0%		+	+	+
	7,0%		+	+	+
	10,0%		+	+	+
	20,0%		-	-	-

* Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ nuôi cấy là 55°C (trừ các thử nghiệm về nhiệt độ sinh trưởng và đặc tính phân loại)

Bảng 2-5

Kết quả phân tích phân loại *Frateribacillus flavoviridis*

Đặc điểm phân loại hóa học	Nội dung	YM17	YM17-5	NaCl_20131 016_04	NaCl_20131 016_19	YM17-2	YM17-3	YM17-4	NaCl_20131 016_24	NaCl_20131 016_28	NaCl_20131 016_30	NaCl_201310 16_34	NaCl_201310 16_37	NaCl_201310 16_38
		MK7 chủ yếu 16:0 iso, 15:0 anteiso, 17:0 anteiso, 17:0 iso	MK7 chủ yếu 16:0 iso, 15:0 anteiso, 17:0 anteiso, 17:0 iso	N.T.	N.T.	MK7 chủ yếu 16:0 iso, 16:0, 17:0 anteiso, 15:0 anteiso	MK7 chủ yếu 16:0 iso, 16:0, 17:0 anteiso, 15:0 anteiso	MK7 chủ yếu 16:0 iso, 16:0, 17:0 anteiso, 15:0 anteiso	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	MK7 chủ yếu 16:0 iso, 16:0, 17:0 anteiso, 15:0 anteiso	MK7 chủ yếu 16:0 iso, 16:0, 17:0 anteiso, 15:0 anteiso
	các axit béo			N.T.	N.T.				N.T.	N.T.	N.T.	N.T.		
	các axit amin của peptidoglycan thành tế bào	Ala, Glu, meso-DAP	Ala, Glu, meso-DAP	N.T.	N.T.	Ala, Glu, meso-DAP	Ala, Glu, meso-DAP	Ala, Glu, meso-DAP	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Ala, Glu, meso-DAP	Ala, Glu, meso-DAP
	Hàm lượng GC của ADN (%mol)	51,4%	51,3%	N.T.	N.T.	51,8%	51,2%	51,6%	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	51,9%	52,4%

* Các tế bào được nuôi cấy ở 52°C được sử dụng để phân tích phân loại hóa học

* Hàm lượng GC của ADN được xác định bằng HPLC

* N.T. Không thử nghiệm

G. Phân tích trình tự bazơ của gen 16S rARN

1) Phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase chain reaction-PCR)

Gen 16S rARN của chủng YM17 được khuếch đại bằng PCR trực tiếp từ khuẩn lạc. PCR bao gồm sử dụng ADN polymeraza Tks Gflex (nhãn hiệu) (do Takara Bio Inc. sản xuất), đoạn mồi EU10F (SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự), và đoạn mồi EU1500R (SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự). Các chất phản ứng PCR được trộn theo tỷ lệ theo hướng dẫn của ADN polymeraza Tks Gflex (nhãn hiệu). PCR bao gồm một chu kỳ xử lý nhiệt ở 94°C trong một phút và 30 chu kỳ tiếp theo mà mỗi chu kỳ bao gồm quá trình xử lý nhiệt ở 98°C trong 10 giây, ở 55°C trong 15 giây, và ở 68°C trong một phút 30 giây.

2) Giải trình tự

Sản phẩm PCR thu được được tinh chế với SV Gel Wizard (nhãn hiệu đã đăng ký) và PCR Clean-Up System (do Promega Corporation sản xuất). Tiến hành giải trình tự nhờ sử dụng sản phẩm đã tinh chế và đoạn mồi EU10F, đoạn mồi EU520F (SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự), đoạn mồi EU907R (SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự) hoặc đoạn mồi EU1500R, để xác định trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng phân lập được.

Trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng YM17 tương ứng với SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự.

Trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng YM17 được đưa xác định độ tương đồng BLAST theo cơ sở dữ liệu gen của Trung tâm thông tin sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.Ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Gen 16S rARN của chủng YM17 có độ tương đồng cao so với *Mechercharimyces asporophorigenens* (độ tương đồng: 91%).

Các trình tự bazơ của các gen 16S rARN của loài có họ với chủng YM17 được thu thập từ cơ sở dữ liệu gen của Trung tâm thông tin sinh học quốc gia và

được phân tích huyết thống.

Các trình tự bazơ đã thu thập của các gen 16S rARN được bắt cặp trình tự bằng chương trình Clustal X 2.0.12, để tạo ra cây phát sinh giống loài bằng phương pháp kết nối liền kề. Fig. 2 minh họa cây phát sinh giống loài. Các chữ số trong dấu ngoặc đơn tương đương với các số truy cập ở ngân hàng gen GenBank, và YM16 là chủng được phân lập bởi các tác giả sáng chế nhờ phương pháp tương tự với phương pháp của sáng chế.

H. Nhận dạng và phân loại chủng YM17

1) Chủng YM17

Như được minh họa ở sơ đồ cây phát sinh giống loài của Fig. 2, nhánh tương ứng với gen 16S rARN của chủng YM17 tách ra từ các nhánh tương ứng với các nhánh của loài thuộc các họ *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, và *Thermoactinomycetaceae*.

Đặc tính của chủng YM17 (tức là, trực khuẩn và hình thành bào tử trong tế bào) được quan sát ở loài thuộc các họ *Bacillaceae* và *Alicyclobacillaceae*, và rất khác với đặc tính (tức là, tạo ra hệ sợi) của loài thuộc họ *Thermoactinomycetaceae*.

Độ tương đồng về trình tự gen 16S rARN được so sánh giữa chủng YM17 và loài thuộc các họ *Bacillaceae* và *Alicyclobacillaceae*. Các kết quả được minh họa ở bảng 3. Chủng YM17 có độ tương đồng về trình tự gen 16S rARN bằng hoặc thấp hơn 89% so với tất cả các loài thuộc các họ này; chủng YM17 hoàn toàn khác về phân loại học với loài thuộc các họ *Bacillaceae* và *Alicyclobacillaceae*. Như được minh họa ở sơ đồ cây phát sinh giống loài của Fig. 2, nhánh của chủng YM17 nằm gần các nhánh của *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Calditerricola satsumensis*, *Caldalkalibacillus thermarum*, và *Caldibacillus debilis*. Do đó, các đặc tính phân loại của chủng YM17 được so sánh với các đặc tính phân loại của bốn chủng này. Các kết quả được minh họa ở

bảng 4.

Dữ liệu về bốn chủng này (ngoại trừ dữ liệu về chủng YM17) được minh họa ở bảng 4 thu được từ International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2002), 52, 1681-1685, Journal of General Microbiology (1971), 67, 9-15, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2011), 61, 631-636, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2006), 56, 1217-1221, and International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2004), 54, 2197-2201.

Loài thuộc giống *Alicyclobacillus* khác biệt ở chỗ chứa các axit béo chủ yếu (ω -xyclohexan-C17:0 và ω -xyclohexan-C19:0); loài này khác với chủng YM17.

Loài thuộc giống *Calditerricola* là vi khuẩn chịu nhiệt cao mà có thể sinh trưởng ở bằng hoặc cao hơn 75°C; loài này khác với chủng YM17.

Loài thuộc giống *Caldalkalibacillus* là Gram dương và có hàm lượng GC là 45%; loài này khác với chủng YM17.

Loài thuộc giống *Caldibacillus* có thể sinh trưởng ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn 65°C và không sinh ra axit từ glucoza; loài này khác với chủng YM17.

Do đó, chủng YM17 được xác định là loài mới thuộc giống *Frateribacillus* trong họ *Bacillaceae* và được định rõ là *Frateribacillus flavoalbus* (dưới đây chủng YM17 có thể gọi là "*Frateribacillus flavoalbus*").

Bảng 3

Độ tương đồng về gen rARN 16S giữa chủng YM17 và các loài thuộc họ *Bacillaceae* và *Alicyclobacillaceae*

gen rARN 16S	Độ tương đồng (%)
<i>Salinibacillus aidingensis</i> (AY321436)	89
<i>Paucisalibacillus globulus</i> (AM114102)	89
<i>Sediminibacillus halophilus</i> (AM905297)	89
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (D16275)	88
<i>Thalassobacillus devorans</i> (AJ717299)	88
<i>Caldalkalibacillus thermarum</i> (AY753654)	88
<i>Vulcanibacillus modesticaldus</i> (AM050346)	88
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (FN428694)	88
<i>Saccharococcus thermophilus</i> (L09227)	88
<i>Aeribacillus pallidus</i> (Z26930)	88
<i>Natronobacillus azotifigens</i> (EU143681)	87
<i>Halolactibacillus halophilus</i> (AB198783)	87
<i>Paraliobacillus ryukyuensis</i> (AM114102)	87
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (AB010863)	87
<i>Terribacillus saccharophilus</i> (AB243845)	87
<i>Lentibacillus salicampi</i> (AY057394)	87
<i>Gracilibacillus halotolerans</i> (AF036922)	87
<i>Cerasibacillus quisquiliarum</i> (AB107894)	87
<i>Halobacillus halophilus</i> (AB681790)	87
<i>Aquisalibacillus elongatus</i> (AM911047)	87
<i>Tenuibacillus multivorans</i> (AY319933)	87
<i>Filobacillus milosensis</i> (AJ238042)	87
<i>Piscibacillus salipiscarius</i> (AB194046)	87
<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i> (AJ238041)	87
<i>Falsibacillus pallidus</i> (EU364818)	87
<i>Bacillus subtilis</i> (AJ276351)	87
<i>Caldibacillus debilis</i> (FN428699)	87
<i>Amphibacillus xylanus</i> (D82065)	86
<i>Pontibacillus chungwhensis</i> (AY553296)	86
<i>Salimicrobium album</i> (X90834)	86
<i>Halalkalibacillus halophilus</i> (AB264529)	86
<i>Salsuginibacillus kocurii</i> (AM492160)	86
<i>Psychrobacillus insolitus</i> (AM980508)	86
<i>Anaerobacillus arseniciselenatis</i> (AF064705)	86
<i>Calditerricola satsumensis</i> (AB250968)	86
<i>Marinococcus halophilus</i> (X90835)	85
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i> (AB199591)	85
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (CP001727)	85
<i>Natribacillus halophilus</i> (AB449109)	84

* Các chữ cái trong dấu ngoặc đơn tương ứng với các số truy cập ở ngân hàng gen

Bảng 4

So sánh các đặc tính giữa chủng YM17 và các loài họ hàng

Đặc điểm	YM17	Alicyclobacillus acidocaldarius	Calditerricola satsumensis	Caldalkalibacillus thermarum	Caldibacillus debilis
Dạng	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
Nhuộm gram	Âm tính	Dương tính hoặc không ổn định	Âm tính	Dương tính	Âm tính
Sinh axit từ đường					
Glucose	+	nd	nd	nd	-
Trehaloza	-	nd	nd	nd	+
Sorbitol	+	-	nd	nd	+
Nồng độ muối sinh trưởng (%)	0,0-7,0%	<5,0%	0,3-4,0%	0,0-6,0%	nd
Nhiệt độ sinh trưởng (°C)	40-55°C	45-65°C	56-83°C	45-65°C	50-70°C
Độ pH sinh trưởng	6,8-9,0	2,0-6,0	6,6-8,9	7,5-10,0	nd
Menaquinon chủ yếu	MK7	nd	nd	MK7	nd
Các axit amin của peptidoglycan của thành tế bào	Ala, Glu, meso-DAP	nd	nd	chứa meso-DAP	nd
Các axit béo chủ yếu*	iso-C16:0, anteiso- C15:0, anteiso-C17:0	ω-xyclohexan-C17:0, ω- xyltohexan-C19:0	iso-C17:0, anteiso- C17:0	iso-C15:0, iso-C17:0	nd
Hàm lượng GC (%mol)	51%	62%	70%	45%	50%

* nd: không mô tả được

* Các axit béo (tỷ lệ: bằng hoặc lớn 10%) ở nhiệt độ sinh trưởng thích hợp

Ví dụ 2

Phân lập loài *Frateribacillus flavoalbus*

Như mô tả ở ví dụ 1 nêu trên, loài *Frateribacillus flavoalbus* khác với loài thuộc các giống và các họ đã biết. Để làm sáng tỏ đặc tính của loài *Frateribacillus flavoalbus*, các chủng thuộc loài (ngoại trừ chủng YM17) được phân lập.

1. Phân lập loài *Frateribacillus flavoalbus*

Các nỗ lực được thực hiện để phân lập các chủng thuộc loài *Frateribacillus flavoalbus* từ phân compôt thu được từ các địa điểm ủ phân ở thành phố Soo và Kagoshima (Kagoshima, Nhật Bản).

Với sự tham khảo các điều kiện nuôi cấy đối với chủng YM17 ở ví dụ 1, phân compôt được bổ sung vào môi trường thạch CYC với sự có mặt hoặc không có mặt natri clorua 7% hoặc 10% và ampicilin 50 µg/ml và được nuôi cấy ở 55°C trong sáu ngày để phân lập các chủng vi khuẩn. Nhiều khuẩn lạc của các vi khuẩn dạng sợi và các khuẩn lạc của các vi khuẩn dạng trực khuẩn được tạo ra trên môi trường này.

Các khuẩn lạc của các vi khuẩn dạng trực khuẩn được tách ra và được đưa đi PCR đặc hiệu để tìm ra loài *Frateribacillus flavoalbus* (xem đoạn 2. dưới đây). Như được minh họa ở bảng 5, 12 chủng được xác định là loài *Frateribacillus flavoalbus*.

Cụ thể, loài *Frateribacillus flavoalbus* được phân lập hiệu quả nhờ nuôi cấy ở 55°C trong môi trường thạch CYC chứa natri clorua 7% và ampicilin 50µg/ml.

12 chủng đã phân lập được kí hiệu là chủng NaCl_20131016_04, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng NaCl_20131016_19, chủng YM17-5, chủng NaCl_20131016_24, chủng NaCl_20131016_28, chủng NaCl_20131016_30, chủng NaCl_20131016_34, chủng NaCl_20131016_37, và

chủng NaCl_20131016_38.

Trong số các chủng này, các chủng YM17-2, YM17-3, YM17-4, và YM17-5 được lưu giữ quốc tế theo hiệp ước Budapest bởi chủ đơn với Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế (Patent Microorganisms Depositary), Viện công nghệ và đánh giá quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation (NITE)). Sự lưu giữ này cụ thể là như dưới đây:

Chủng YM17-2

- (1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia
- (2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản (TEL: 81-438-20-5580)
- (3) Số truy cập: NITE BP-01948
- (4) Số chỉ để nhận dạng: YM17-2
- (5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 6 tháng 10 năm 2014

Chủng YM17-3

- (1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia
- (2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản (TEL: 81-438-20-5580)
- (3) Số truy cập: NITE BP-01949
- (4) Số chỉ để nhận dạng: YM17-3
- (5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 6 tháng 10 năm 2014

Chủng YM17-4

- (1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia
- (2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản (TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01950

(4) Số chỉ để nhận dạng: YM17-4

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 6 tháng 10 năm 2014

Chủng YM17-5

(1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia

(2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản
(TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01925

(4) Số chỉ để nhận dạng: YM17-5

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 28 tháng 8 năm 2014

2. PCR đặc hiệu để phát hiện loài *Frateribacillus flavoalbus*

PCR đặc hiệu để phát hiện loài *Frateribacillus flavoalbus* được tiến hành như mô tả dưới đây. Đoạn mồi TIP155F1

(5'-ATACCGGATAAGAGGCTTTT-3') (SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự) và đoạn mồi TIP155R1 (5'-TGGTACCGTCACGCTAAGA-3') (SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự) được chuẩn bị nhờ sử dụng trình tự bazơ đặc hiệu với gen 16S rARN của chủng YM17.

PCR bao gồm sử dụng ADN polymeraza Tks Gflex (nhãn hiệu), đoạn mồi TIP155F1, đoạn mồi TIP155R1, và ADN của chủng đã phân lập. Các chất phản ứng PCR được trộn theo tỷ lệ theo hướng dẫn của ADN polymeraza Tks Gflex (nhãn hiệu). PCR bao gồm một chu kỳ xử lý nhiệt ở 94°C trong một phút và 25 chu kỳ tiếp theo mà mỗi chu kỳ bao gồm quá trình xử lý nhiệt ở 98°C trong 10 giây, ở 55°C trong 15 giây, và ở 68°C trong một phút. Nếu sản phẩm được khuếch đại của chủng được phát hiện bằng điện di có kích cỡ khoảng 328 bp, thì chủng này được xác định là loài *Frateribacillus flavoalbus*.

Bảng 5

Phân lập có chọn lựa *Frateribacillus flavovalbus*

Nguồn	Môi trường phân lập				Kết quả phân lập		
	Môi trường cơ bản	Natri clorua (%)	Ampixilin 50µg/ml	số chủng trực khuẩn phân lập được	PC đặc hiệu <i>F. flavovalbus</i>	Số của chủng	
						Số chủng đạt kết quả	tỷ lệ
Lô phân compôt 1 từ địa điểm ủ ở thành phố Soo	7	-	-	1	0	0	0%
		+	+	5	2	2	40%
	10	-	-	1	0	0	0%
		+	+	5	0	0	0%
Lô phân compôt 2 từ địa điểm ủ ở thành phố Soo	7	-	-	Không	-	-	-
		+	+	3	2	2	67%
	10	-	-	Không	-	-	-
		+	+	1	0	0	0%
Lô phân compôt 3 từ địa điểm ủ ở thành phố Soo	7	-	-	Không	-	-	-
		+	+	3	2	2	67%
	10	-	-	2	0	0	0
		+	+	2	1	1	50%
Lô phân compôt 4 từ địa điểm ủ ở thành phố Soo	7	-	-	1	-	-	-
		+	+	3	2	2	67%
	10	-	-	2	0	0	0%
		+	+	3	1	1	33%
Phân compôt từ địa điểm ủ ở thành phố Kagoshima	7	-	-	1	0	0	0%
		+	+	2	2	2	100%
	10	-	-	không	-	-	-
		+	+	1	0	0	0%

3. Phân tích phân loại chủng đã phân lập

Các đặc tính phân loại của 12 chủng được phân lập nhờ các quy trình 1 và 2 được mô tả ở trên được nghiên cứu như trong trường hợp chủng YM17 ở ví dụ 1. Các kết quả được minh họa ở các bảng 2-1 đến 2-5.

4. Phân tích trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng đã phân lập

Các trình tự bazơ của các gen 16S rARN của 12 chủng được phân lập nhờ các quy trình 1 và 2 được mô tả ở trên được xác định như trong trường hợp chủng YM17 ở ví dụ 1. Các trình tự bazơ của các gen 16S rARN của các chủng này được thể hiện trong SEQ ID No: 8 đến 19 trong danh mục trình tự. SEQ ID No: 8 tương ứng với chủng NaCl_20131016_04, SEQ ID No: 9 của chủng YM17-2, SEQ ID No: 10 của chủng YM17-3, SEQ ID No: 11 của chủng YM17-4, SEQ ID No: 12 của chủng NaCl_20131016_19, SEQ ID No: 13 của chủng YM17-5, SEQ ID No: 14 của chủng NaCl_20131016_24, SEQ ID No: 15 của chủng NaCl_20131016_28, SEQ ID No: 16 của chủng NaCl_20131016_30, SEQ ID No: 17 của chủng NaCl_20131016_34, SEQ ID No: 18 của chủng NaCl_20131016_37, và SEQ ID No: 19 của chủng NaCl_20131016_38.

Bảng 6 minh họa trình tự bazơ tương đồng giữa gen 16S rARN của chủng YM17 và các gen 16S rARN của 12 chủng này. Như được minh họa ở bảng 6, trình tự bazơ của gen 16S rARN của một trong số 12 chủng đã phân lập có độ tương đồng bằng hoặc cao hơn 98,7% so với trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng YM17.

Bảng 6

Độ tương đồng về trình tự bazơ của gen 16S rARN

chủng	Độ tương đồng về trình tự bazơ của gen 16S rARN (%)												
	NaCl_20131016_04	YM17-2	YM17-3	YM17-4	NaCl_20131016_19	YM17-5	NaCl_20131016_24	NaCl_20131016_28	NaCl_20131016_30	NaCl_20131016_34	NaCl_20131016_37	NaCl_20131016_38	YM17
NaCl_20131016_04	100,00												
YM17-2	99,79	100,00											
YM17-3	99,72	99,93	100,00										
YM17-4	99,79	100,00	99,93	100,00									
NaCl_20131016_19	99,72	99,86	99,93	99,86	100,00								
YM17-5	99,08	99,29	99,36	99,29	99,29	100,00							
NaCl_20131016_24	99,79	100,00	99,93	100,00	99,86	99,29	100,00						
NaCl_20131016_28	99,72	99,93	99,86	99,93	99,79	99,36	99,93	100,00					
NaCl_20131016_30	99,86	99,93	99,86	99,93	99,86	99,22	99,93	99,86	100,00				
NaCl_20131016_34	99,79	100,00	99,93	100,00	99,86	99,29	100,00	99,93	99,93	100,00			
NaCl_20131016_37	99,72	99,93	100,00	99,93	99,93	99,36	99,93	99,86	99,86	99,93	100,00		
NaCl_20131016_38	99,72	99,79	99,86	99,79	99,86	99,36	99,79	99,72	99,86	99,79	99,86	100,00	
YM17	98,79	98,86	98,93	98,86	98,93	98,93	98,86	98,93	98,93	98,86	98,93	99,08	100,00

5. Quá trình lai ADN-ADN

Các ADN hệ gen của sáu chủng được phân lập nhờ các quy trình 1 và 2 được mô tả ở trên và ADN hệ gen của chủng YM17 được đưa đi lai ADN-ADN. ADN của chủng YMO81 của *Calditerricola satsumensis* (tức là, loài họ hàng) được sử dụng làm đối chứng âm. Các ADN hệ gen được tạo ra bằng phương pháp được sử dụng để xác định hàm lượng GC trong ví dụ 1.

Mỗi ADN hệ gen có nồng độ bằng hoặc cao hơn 500µg/ml, OD260/OD280 bằng hoặc cao hơn 1,8, và OD260/OD230 bằng hoặc cao hơn 2,0 và không bị lẫn với ARN; ADN có chất lượng đủ cao để sử dụng cho quá trình lai ADN-ADN.

Quá trình lai ADN-ADN được tiến hành theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu tham khảo 2 và "*Biseibutsu no Bunrui Dotei Jikkenho*

(Experimental Classification and Identification of Microorganisms)" (do Springer Japan xuất bản).

Tấm ADN được chuẩn bị. Dung dịch ADN hệ gen được pha loãng với SSC 0,1× đến 100µg/ml. Dung dịch ADN đã pha loãng được gia nhiệt ở 100°C trong năm phút để tạo ra ADN sợi đơn, tiếp theo được tôi với băng. Dung dịch ADN bị biến tính do nhiệt được pha loãng 10 lần với dung dịch PBS-Mg đến 10µg/ml. Dung dịch ADN 10µg/ml được tra vào các giếng (mỗi giếng 100µl) của vi đĩa, và vi đĩa được gắn kín và được để yên ở 30°C trong ba giờ hoặc lâu hơn. Sau đó, dung dịch ADN trong các giếng được loại bỏ để tạo ra tấm ADN để thử nghiệm. ADN tinh dịch cá hồi được sử dụng làm đối chứng trên nền.

Song song với sự chuẩn bị tấm ADN, ADN được đánh dấu với photobiotin. Dung dịch ADN 500µg/ml được điều chế (30µl) và được xử lý với bể siêu âm trong 10 phút để phân cắt ADN. Dung dịch photobiotin 1mg/ml (25µl) được bổ sung vào dung dịch chứa ADN đã phân cắt. ADN sau khi được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch được đánh dấu với photobiotin bằng cách chiếu sáng trong 30 phút bằng đèn thủy ngân áp suất thấp (250W) trong điều kiện làm mát bằng băng. Để loại bỏ photobiotin thừa, dung dịch đệm Tris-HCl 0,1M (độ pH 9,0) (540µl) được bổ sung vào dung dịch ADN được chiếu sáng, và sau đó 2-butanol (600µl) được bổ sung vào hỗn hợp này. Hỗn hợp thu được được ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong năm giây, và phần nổi ở trên bề mặt chứa photobiotin dư thừa được loại bỏ. Quy trình này bao gồm sự bổ sung 2-butanol và sự loại bỏ photobiotin dư thừa được tiến hành tổng cộng hai lần. Dung dịch chứa ADN được đánh dấu bằng photobiotin được gia nhiệt ở 100°C trong năm phút rồi sau đó tôi với băng. Dung dịch thu được được sử dụng để lai.

Quá trình lai sau đó được tiến hành. Dung dịch lai sơ bộ được cho vào các giếng (mỗi giếng 200µl) của tấm ADN rồi sau đó được để yên ở 37°C trong 15 phút. Dung dịch của ADN đã đánh dấu bằng photobiotin đã biến tính do nhiệt

(300 μ l) được trộn với dung dịch lai (6ml). Dung dịch lai sơ bộ được loại bỏ khỏi các giếng của tấm ADN, và dung dịch lai chứa ADN được đánh dấu bằng photobiotin được cho vào các giếng (mỗi giếng 100 μ l). Tấm ADN được gắn kín rồi sau đó được giữ yên ở 46°C trong hai giờ hoặc lâu hơn để lai. Sau khi lai, dung dịch lai chứa ADN được đánh dấu bằng photobiotin được loại bỏ, và mỗi giếng được rửa với dung dịch SSC 1 $\times$ (300 μ l) tổng cộng ba lần.

Dung dịch streptavidin-enzym được tra vào các giếng đã rửa (mỗi giếng 100 μ l). Tấm ADN được giữ yên ở 37°C trong 30 phút, rồi sau đó dung dịch streptavidin-enzym được loại bỏ. Mỗi giếng được rửa với dung dịch SSC 1 $\times$ (100 μ l) rồi sau đó được rửa với dung dịch SSC 1 $\times$ (300 μ l) tổng cộng ba lần. Dung dịch nền huỳnh quang (100 μ l) được bổ sung vào mỗi giếng đã rửa, và cường độ huỳnh quang được đo với máy đọc khay vi thể (bước sóng kích thích: 360nm, bước sóng đo: 450nm). Tấm ADN được giữ ở 37°C, và cứ một phút cường độ huỳnh quang được đo một lần. Cường độ huỳnh quang tương ứng với mỗi tổ hợp ADN-ADN được tính như dưới đây: các trị số trung bình (tương ứng với bốn giếng) được chọn từ tất cả các trị số (tương ứng với sáu giếng) và được tính trung bình, và cường độ huỳnh quang trung bình của các giếng chứa ADN tinh dịch cá hồi bám vào được trừ từ giá trị trung bình của bốn trị số trung bình. Độ tương đồng (%) được biểu thị bằng tỷ lệ của cường độ huỳnh quang thu được với cường độ huỳnh quang trong trường hợp sử dụng ADN của chỉ một chủng trong các giếng và để đánh dấu.

Tài liệu tham khảo 2: Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E., 1989. Sự lai huỳnh quang axit deoxyribonucleic-axit deoxyribonucleic trong các giếng vi pha loãng như là một lựa chọn khác cho lai nhờ màng lọc trong đó các chất đồng vị phóng xạ được sử dụng để xác định quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39: pp. 224-229.

Thuốc thử

- (1) Dung dịch PBS-Mg (MgCl_2 0,95g/PBS 100ml)
- (2) Đệm Tris-HCl 0,1M (Tris: 12,1g, EDTA-2Na: 0,4g, độ pH 9,0, nước siêu tinh khiết: được bổ sung để đạt được tổng thể tích 1000ml)
- (3) Dung dịch tiền lai (20×SSC: 1ml, dung dịch 50×Denhardt: 1ml, ADN cá hồi đã biến tính 10mg/ml: 0,1ml, formamit: 5ml, nước siêu tinh khiết: 2,9ml)
- (4) Dung dịch lai (20×SSC: 1ml, dung dịch 50×Denhardt: 1ml, 10mg/ml ADN cá hồi đã biến tính: 0,1ml, formamit: 5ml, dextran sulfat: 0,25g, nước siêu tinh khiết: 2,8ml)
- (5) Dung dịch streptavidin-enzym (streptavidin- β -D-galactosidaza liên hợp: 10 μ l, albumin huyết thanh bò 0,5% (mảnh V)/dung dịch PBS: 10ml)
- (6) Dung dịch nền huỳnh quang (dung dịch 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosit 10mg/ml: 100 μ l, PBS+ dung dịch MgCl_2 1mmol: 10ml)

Bảng 7 minh họa các kết quả của phép lai ADN-ADN.

Như được minh họa ở bảng 7, hai chủng bất kỳ trong các chủng YM-17, YM17-2, YM17-3, YM17-4, YM17-5, NaCl_20131016_37, và NaCl_20131016_38 có độ tương đồng ADN-ADN bằng hoặc cao hơn 70% .

Như được mô tả ở tài liệu tham khảo 3, hai chủng có độ tương đồng ADN-ADN bằng hoặc cao hơn 70% được xem là thuộc cùng một loài. Do đó, bảy chủng này được xác định là thuộc cùng một loài.

Tài liệu tham khảo 3: Stackebrandt, E. & Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today Nov.: pp. 152-155

Bảng 7

Độ tương đồng để lại ADN-ADN

chủng	Độ tương đồng để lại ADN-ADN (%)							
					NaCl_2013		YM17	YMO81
	YM17-2	YM17-3	YM17-4	MY17-5	1016_37	1016_38		
YM17-2	100,0							
YM17-3	106,4	100,0						
YM17-4	95,3	100,0	100,0					
MY17-5	74,5	73,3	74,7	100,0				
NaCl_20131016_37	91,7	80,1	74,3	77,6	100,0			
NaCl_20131016_38	84,4	93,2	91,2	72,5	86,2	100,0		
YM17	72,6	79,2	74,3	74,7	70,1	78,9	100,2	
YMO81 <i>C.satsumensis</i>	2,9	1,6	2,0	2,3	2,8	2,2	1,2	100,0

6. Các đặc tính của *Frateribacillus flavoalbus*

Các kết quả phân tích nêu trên và các thử nghiệm đã chứng minh là loài *Frateribacillus flavoalbus* có các đặc tính 1) đến 10) dưới đây:

- 1) *Frateribacillus flavoalbus* là trực khuẩn Gram âm mà hình thành bào tử;
- 2) *Frateribacillus flavoalbus* âm tính với oxidaza, dương tính với catalaza, và hiếu khí;
- 3) *Frateribacillus flavoalbus* không sinh ra axit trong môi trường LB (độ pH 8,0) chứa 1% đường và 2,0% NaCl nếu đường là D-galactoza hoặc sucroza, và sinh ra axit nếu đường là D-glucoza, lactoza, D-manitol, glyxerin, hoặc N-axetylglucozamin;
- 4) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu từ 45°C đến 55°C mà không sinh trưởng ở nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn 35°C hoặc bằng hoặc cao hơn 65°C;
- 5) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng ở độ pH tối ưu từ 7,0 đến 8,0 mà không sinh trưởng ở độ pH bằng hoặc thấp hơn 5,7 hoặc bằng hoặc cao hơn 10,0;
- 6) *Frateribacillus flavoalbus* sinh trưởng trong môi trường CYC chứa NaCl được bổ sung ở nồng độ cuối lên đến 7%;

- 7) *Frateribacillus flavoalbus* chứa MK7 dưới dạng menaquinon chủ yếu;
- 8) *Frateribacillus flavoalbus* chứa peptidoglycan của thành tế bào chứa alanin, axit glutamic, và axit mesodiaminopimelic (meso-DAP);
- 9) *Frateribacillus flavoalbus* có ADN hệ gen có hàm lượng GC từ 51,2% đến 52,4%; và
- 10) *Frateribacillus flavoalbus* chứa iso-C16:0 dưới dạng axit béo chính của tế bào.

7. Phân loại loài phụ của *Frateribacillus flavoalbus*

Fig. 3 minh họa sơ đồ cây phát sinh giống loài của chủng YM17 và 12 chủng đã phân lập (chủng NaCl_20131016_04, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng NaCl_20131016_19, chủng YM17-5, chủng NaCl_20131016_24, chủng NaCl_20131016_28, chủng NaCl_20131016_30, chủng NaCl_20131016_34, chủng NaCl_20131016_37, và chủng NaCl_20131016_38) trên cơ sở gen 16S rARN. Như được minh họa ở Fig. 3, chủng YM17 và chủng YM17-5 phân nhánh từ các chủng khác đối với gen 16S rARN.

Như được minh họa ở bảng 8, bốn axit béo chủ yếu của tế bào của chủng YM17 hoặc chủng YM17-5 là iso-C16:0, anteiso-C17:0, anteiso-C15:0, và iso-C17:0. Ngược lại, bốn axit béo chủ yếu của tế bào của chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng NaCl_20131016_37, hoặc chủng NaCl_20131016_38 là iso-C16:0, C16:0, anteiso-C17:0, và anteiso-C15:0. Các kết quả này cho thấy rằng chủng YM17 và chủng YM17-5 thuộc loài phụ khác với loài phụ của các chủng còn lại, mặc dù tất cả các chủng này đều thuộc cùng loài *Frateribacillus flavoalbus*.

Bảng 8

Tỷ lệ axit béo của tế bào *Frateribacillus flavovallbus* (%)

Loại axit béo	Chủng					
	YM17	TM17-5	YM17-2	YM17-3	YM17-4	NaCl_20131016_ NaCl_20131016_37_38
iso-C14:0	1,59	1,16	2,25	1,04	0,93	1,17
C14:0	0,43	0,26	1,46	1,50	1,18	1,82
iso-C15:0	6,79	6,99	5,19	1,51	1,70	4,13
anteiso-C15:0	16,59	12,95	12,66	4,40	4,71	9,54
C15:0	---	---	---	---	---	---
iso-C16:0	37,92	42,59	41,09	41,23	40,26	34,12
C16:0	6,69	3,82	17,81	34,74	33,64	29,92
iso-C17:0	8,89	9,03	5,15	2,65	2,67	4,83
anteiso-C17:0	16,48	19,75	10,21	6,84	7,53	10,05
C17:0	0,35	0,12	0,29	0,60	0,51	0,53
iso-C18:0	1,00	1,23	0,73	1,51	2,22	0,90
C18:0	0,30	0,23	0,78	2,62	3,05	1,36
Loại khác	2,97	1,87	2,38	1,36	1,60	1,63
						2,77

Do đó, hai chủng dưới đây: YM17 và YM17-5 được định rõ là *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus*, và 11 chủng dưới đây: NaCl_20131016_04, YM17-2, YM17-3, YM17-4, NaCl_20131016_19, NaCl_20131016_24, NaCl_20131016_28, NaCl_20131016_30, NaCl_20131016_34, NaCl_20131016_37, và NaCl_20131016_38 được định rõ là *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *finetarium*.

Do đó, *Frateribacillus flavoalbus* là loài mới bao gồm hai loài phụ dưới đây: *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus* và *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *finetarium*.

8. Hoạt tính phân giải protein của *Frateribacillus flavoalbus*

Frateribacillus flavoalbus được đánh giá về hoạt tính phân giải protein của nó. Gelatin 2,0% hoặc casein 0,4% được bổ sung vào môi trường cơ bản (natri clorua: 2,0%, cao nấm men: 0,1%), và độ pH của môi trường được điều chỉnh đến 8,0. Thạch 1,5% được bổ sung vào môi trường này và được khử trùng trong nồi hấp ở 120°C trong 20 phút, để tạo ra môi trường thử nghiệm.

Chủng YM17, chủng NaCl_20131016_04, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng NaCl_20131016_19, chủng YM17-5, chủng NaCl_20131016_24, chủng NaCl_20131016_28, chủng NaCl_20131016_30, chủng NaCl_20131016_34, chủng NaCl_20131016_37, hoặc chủng NaCl_20131016_38 được dùng cho môi trường thử nghiệm và được nuôi cấy ở 55°C trong bảy ngày. Sau đó, dung dịch axit clohydric-thủy ngân (II) clorua (thủy ngân (II) clorua: 15g, axit clohydric đậm đặc: 20ml, nước cất: 100ml) được bổ sung nhỏ giọt vào môi trường thử nghiệm, và hoạt tính phân giải protein được đánh giá dựa vào sự hình thành halo (viền sáng). Các kết quả thử nghiệm đã cho thấy rằng tất cả 13 chủng này đều có khả năng làm thoái biến gelatin và casein.

9. Sự sinh trưởng của *Frateribacillus flavoalbus* trong phân compôt và khả năng

làm thoái biến hữu cơ của nó

Frateribacillus flavoalbus được đánh giá về sự sinh trưởng trong phân compôt và khả năng làm thoái biến hữu cơ của nó.

Phân compôt được khử trùng hai lần trong nồi hấp ở nhiệt độ 120°C trong 30 phút. Chủng thử nghiệm được nuôi cấy trong môi trường LB đã lọc và khử trùng chứa dung dịch chiết nấm men 10% (1ml), dung dịch casein 1% hoặc nước vô trùng (3ml), và NaCl 2% (độ pH 8,0) ở 55°C trong một ngày. Môi trường lỏng thu được (1ml) được bổ sung vào phân compôt đã khử trùng (10g), và hỗn hợp này được khuấy với thìa y khoa đã khử trùng để làm cho nước thấm vào toàn bộ phân compôt. Vật chứa được hàn kín sao cho lượng pha khí được tạo ra đầy đủ ở phía trên hỗn hợp, và chủng này được nuôi cấy trong phân compôt ở 55°C trong ba ngày (sau đây có thể gọi là "sự nuôi cấy trong phân compôt"). Đối với đối chứng âm, môi trường LB chứa NaCl 2% đã khử trùng (độ pH 8,0) được bổ sung vào phân compôt thay cho môi trường nuôi cấy lỏng của chủng này. Chủng thử nghiệm được sử dụng là chủng YM17, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng YM17-5, chủng NaCl_20131016_37, hoặc chủng NaCl_20131016_38.

Quan sát bằng kính hiển vi sản phẩm được tạo ra bằng nuôi cấy trong phân compôt 3 ngày cho thấy các tế bào vi khuẩn đã sinh trưởng thành công trong phân compôt chứa môi trường lỏng của một trong các chủng thử nghiệm dưới đây: YM17, YM17-2, YM17-3, YM17-4, YM17-5, NaCl_20131016_37, và NaCl_20131016_38. Ngược lại, không có tế bào vi khuẩn nào quan sát được ở đối chứng âm (tức là, không bổ sung môi trường nuôi cấy của chủng). Các Fig. 4A và 4B là các ảnh chụp cấu trúc tế vi minh họa cho trạng thái sau nuôi cấy ba ngày của chủng YM17 và đối chứng âm trong phân compôt chứa casein.

Như được minh họa ở Fig. 4A (xem các vòng tròn), quan sát thấy sinh trưởng thành công của các tế bào vi khuẩn của chủng YM17. Như được minh

họa ở Fig. 4B, đối với đối chứng âm, chỉ quan sát thấy các hạt phân compôt (tức là, không có tế bào vi khuẩn).

Protein được chiết từ sản phẩm được tạo ra bằng cách nuôi cấy trong phân compôt 3 ngày. Tris-HCl (độ pH 8,0) (30ml) được bổ sung vào sản phẩm được nuôi cấy để tạo ra huyền phù. Huyền phù được giữ yên ở nhiệt độ trong phòng trong ba giờ. Sau đó, huyền phù được đưa đi lọc (giấy lọc: loại: NO.5B, 110 mm, do Advantec Toyo Kaisha, Ltd. sản xuất), và chất lọc được thu hồi. Phần cặn được rửa với Tris-HCl (độ pH 8,0) sao cho tổng lượng chất lọc được điều chỉnh đến 30ml. Amoni sulfat (14,2g) được bổ sung vào chất lọc (30ml), và amoni sulfat được hòa tan trong đó cùng với khuấy từ từ. Sau đó, dung dịch amoni sulfat được để trên băng qua đêm. Chất lỏng thu được được ly tâm ở 4°C và 10.000g trong 30 phút. Phần nổi ở trên bề mặt được loại bỏ, và chất kết tủa được thu hồi. Chất kết tủa được hòa tan trong Tris-HCl (độ pH 8,0) (1ml), và dung dịch được thẩm tách với màng thẩm tách Spectra/Pore 1 (nhãn hiệu đã đăng ký) (do Spectrum Laboratories, Inc. sản xuất, MW: 6000 đến 8000) trong Tris-HCl (độ pH 8,0) để loại muối. Thể tích của dung dịch đã loại muối được điều chỉnh đến 2ml với Tris-HCl (độ pH 8,0). Bằng cách đó tạo ra mẫu thử nghiệm dùng cho kỹ thuật zymography.

Gelatin (nồng độ cuối: 0,1%), dùng làm chất nền, được bổ sung vào gel điện di đối với kỹ thuật zymography. Dung dịch protein đã loại muối (15µl) được trộn với dung dịch đệm nạp (5µl), và hỗn hợp này (20µl) trải qua kỹ thuật zymography.

Sau khi điện di, gel được đặt trong Tris-HCl (độ pH 8,0) chứa Triton X 0,2% trong 10 phút. Dung dịch đệm này sau đó được loại bỏ, và gel được rửa hai lần với Tris-HCl (độ pH 8,0) không chứa Triton X. Gel đã rửa được ngâm trong Tris-HCl (độ pH 8,0) (20ml) chứa CaCl_2 2mM và MgSO_4 2mM và được giữ yên ở 55°C trong 16 giờ để nuôi cấy chủ động. Sau đó, Tris-HCl (độ pH 8,0)

(20ml) chứa CaCl_2 2mM và MgSO_4 2mM được loại bỏ, và gel được nhuộm với Coomassie trong 30 phút. Gel đã nhuộm Coomassie được khử màu để đánh giá hoạt tính phân giải protein.

Các kết quả của kỹ thuật zymography đã cho thấy rằng protein được chiết từ sản phẩm được tạo ra bằng cách nuôi cấy trong phân compôt mà không có casein có khả năng làm thoái biến gelatin, và protein được chiết từ sản phẩm được tạo ra bằng cách nuôi cấy trong phân compôt mà có casein có khả năng làm thoái biến gelatin mạnh hơn. Trong trường hợp đối chứng âm (tức là, không bổ sung môi trường của chúng), protein được chiết từ sản phẩm được tạo ra bằng cách nuôi cấy trong phân compôt không có khả năng làm thoái biến gelatin bất kể sự bổ sung casein.

Hoạt tính phân giải protein quan sát được trong trường hợp nuôi cấy trong phân compôt chứa môi trường lỏng của chúng (ngay cả không có casein) được cho là do kích thích hoạt tính bởi các protein vẫn còn trong phân compôt (tức là, nguyên liệu cơ bản). Nuôi cấy trong phân compôt mà có casein dẫn đến kích thích hoạt tính mạnh hơn.

Các kết quả nêu trên đã chứng minh là loài *Frateribacillus flavoalbus* (chẳng hạn, chủng YM17, chủng YM17-2, chủng YM17-3, chủng YM17-4, chủng YM17-5, chủng NaCl_20131016_37, hoặc chủng NaCl_20131016_38) sinh trưởng trong phân compôt và có hoạt tính phân giải protein. Các Fig. 5A và 5B minh họa các kết quả của kỹ thuật zymography gelatin. Fig. 5A minh họa các kết quả của kỹ thuật zymography protein được chiết từ sản phẩm được tạo ra bằng cách nuôi cấy trong phân compôt mà không có casein, và Fig. 5B minh họa các kết quả của kỹ thuật zymography protein được chiết từ sản phẩm được tạo ra bằng cách nuôi cấy trong phân compôt mà có casein.

Các thuốc thử

(1) Tris-HCl (độ pH 8,0) (Tris: 6,1g, điều chỉnh pH đến 8,0 với axit clohydric

đậm đặc, nước siêu tinh khiết: được bổ sung để đạt được tổng thể tích 1000ml)

(2) Gel điện di cho kỹ thuật zymography

Lớp tách (acrylamit 30%: 2000 μ l, Tris-HCl 1,5M (độ pH 8,5): 1500 μ l, nước siêu tinh khiết: 1800 μ l, SDS 10%: 60 μ l, APS 10%: 50 μ l, TEMED: 5 μ l, gelatin 1%: 600 μ l)

Lớp chùng (acrylamit 30%: 450 μ l, Tris-HCl 0,5M (độ pH 6,5): 750 μ l, nước siêu tinh khiết: 1700 μ l, SDS 10%: 30 μ l, APS 10%: 50 μ l, TEMED: 5 μ l)

Gel được tạo ra bằng cách hóa rắn lớp tách, sắp xếp lớp chùng trên lớp tách đã hóa rắn, và hóa rắn lớp chùng.

(3) Dung dịch đệm điện di 10 $\times$ cho kỹ thuật zymography (Tris: 30,3g, glyxin: 144g, nước siêu tinh khiết: được bổ sung để đạt được tổng thể tích 1000ml)

Đối với kỹ thuật zymography điện di, dung dịch đệm điện di 10 $\times$ dùng cho kỹ thuật zymography được pha loãng với nước siêu tinh khiết thành dung dịch đệm điện di 1 $\times$, và SDS được bổ sung vào dung dịch đệm đã pha loãng để đạt được nồng độ cuối là 0,1%.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất vi sinh vật mới là loài mới thuộc giống *Frateribacillus*.

Vi sinh vật mới này hữu ích, chẳng hạn, để xử lý các chất thải hữu cơ (chẳng hạn, các chất bài tiết của người và bùn). Vi sinh vật mới này còn có thể được sử dụng cho các ứng dụng khác nhau.

Chỉ dẫn về vật liệu sinh học được lưu giữ

(1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia

(2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản
(TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01764

(4) Số nhận dạng: YM17

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 29 tháng 11 năm 2013

Chỉ dẫn về vật liệu sinh học được lưu giữ

(1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia

(2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản
(TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01948

(4) Số nhận dạng: YM17-2

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 6 tháng 10 năm 2014

Chỉ dẫn về vật liệu sinh học được lưu giữ

(1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia

(2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản
(TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01949

(4) Số nhận dạng: YM17-3

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 6 tháng 10 năm 2014

Chỉ dẫn về vật liệu sinh học được lưu giữ

(1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia

(2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản
(TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01950

(4) Số nhận dạng: YM17-4

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: Ngày 6 tháng 10 năm 2014

Chỉ dẫn về vật liệu sinh học được lưu giữ

(1) Tổ chức nhận lưu giữ: Cơ quan lưu giữ các vi sinh vật sáng chế, Viện công

nghệ và đánh giá quốc gia

(2) Địa chỉ: 2-5-8 Kazusa Kamatari Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản

(TEL: 81-438-20-5580)

(3) Số truy cập: NITE BP-01925

(4) Số nhận dạng: YM17-5

(5) Ngày lưu giữ đầu tiên: ngày 28 tháng 8 năm 2014

YÊU CẦU BẢO HỘ

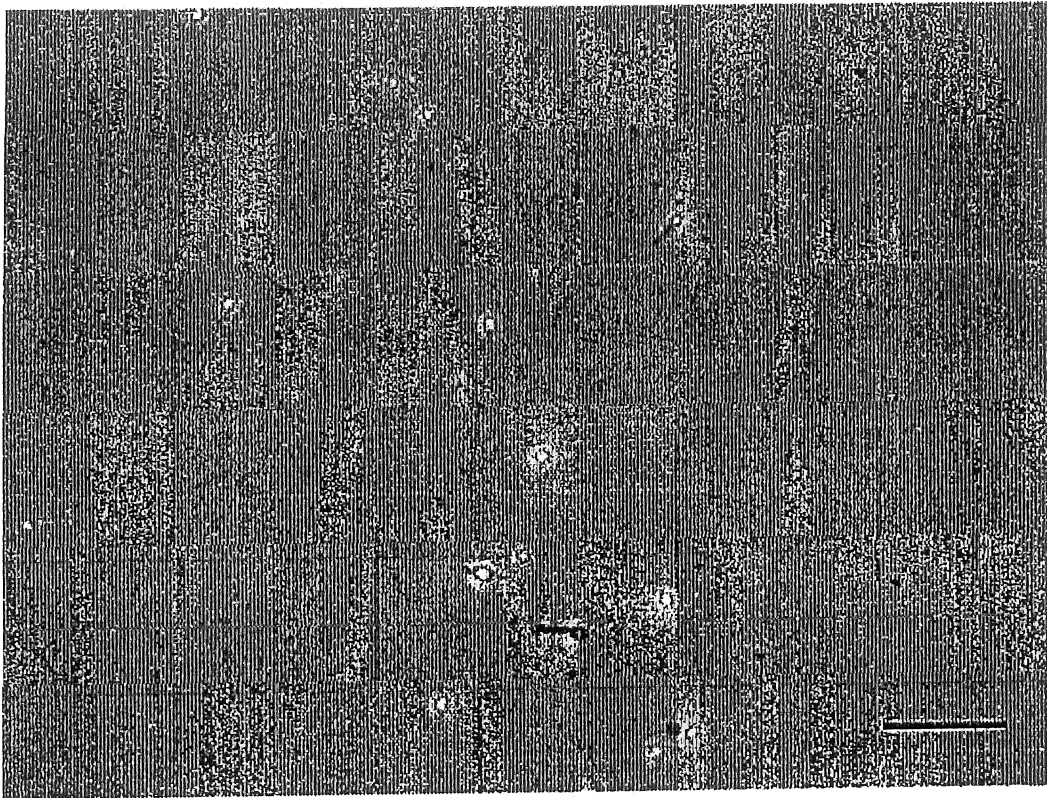
1. *Frateribacillus flavoalbus* là loài mới của *Frateribacillus*; và là một chủng bất kỳ trong số chủng YM17: NITE BP-01764; chủng YM17-2: NITE BP-01948; chủng YM17-3: NITE BP-01949; chủng YM17-4: NITE BP-01950; hoặc chủng YM17-5: NITE BP-01925; và

có các đặc tính 1) đến 10) dưới đây:

- 1) nhuộm gram là trực khuẩn âm và tạo ra bào tử;
- 2) kết quả của thử nghiệm oxidaza là âm tính, kết quả của thử nghiệm catalaza là dương tính và hiếu khí;
- 3) sinh ra axit khi D-galactosa hoặc sucroza được bổ sung dưới dạng đường vào môi trường LB (độ pH = 8,0) chứa 1% đường và 2,0% NaCl, nhưng không sinh ra axit khi D-glucoza, lactoza, D-manitol, glyxerin hoặc N-axetylglucozamin được bổ sung dưới dạng đường vào môi trường LB này;
- 4) nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là từ 45°C đến 55°C, và không sinh trưởng ở nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn 35°C hoặc bằng hoặc cao hơn 65°C;
- 5) độ pH tối ưu là từ 7,0 đến 8,0, và không sinh trưởng ở độ pH bằng hoặc thấp hơn 5,7 hoặc độ pH bằng hoặc cao hơn 10,0;
- 6) cũng sinh trưởng ngay cả khi NaCl được bổ sung vào môi trường CYC cho đến khi nồng độ cuối đạt đến 7%;
- 7) menaquinon chủ yếu là MK7;
- 8) thành phần axit amin của peptidoglycan thành tế bào chứa alanin, axit glutamic, và axit meso diaminopimelic;
- 9) hàm lượng GC của ADN hệ gen là từ 51,2% đến 52,4%; và
- 10) axit béo chính của tế bào là iso-C16:0.

2. *Frateribacillus flavoalbus* theo điểm 1, trong đó axit béo của tế bào còn chứa một hoặc nhiều hợp chất trong số anteiso-C15:0, C16:0, anteiso-C17:0, và iso-C17:0.
3. *Frateribacillus flavoalbus* theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng này là *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *flavoalbus* chứa axit béo của tế bào là iso-C16:0, và còn chứa anteiso-C15:0, anteiso-C17:0, và iso-C17:0.
4. *Frateribacillus flavoalbus* theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng này là *Frateribacillus flavoalbus* subsp. *fimetarium* chứa axit béo của tế bào là iso-C16:0, và còn chứa anteiso-C15:0, C16:0, và anteiso-C17:0.
5. Phương pháp xử lý chất thải hữu cơ, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng *Frateribacillus flavoalbus* theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chất thải hữu cơ này là chất bài tiết, bùn hữu cơ, hoặc thức ăn dư thừa.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó chất bài tiết là chất bài tiết của động vật.
8. Phương pháp làm thoái biến protein, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng *Frateribacillus flavoalbus* theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4.

FIG.1



Bacillaceae
FAMILY

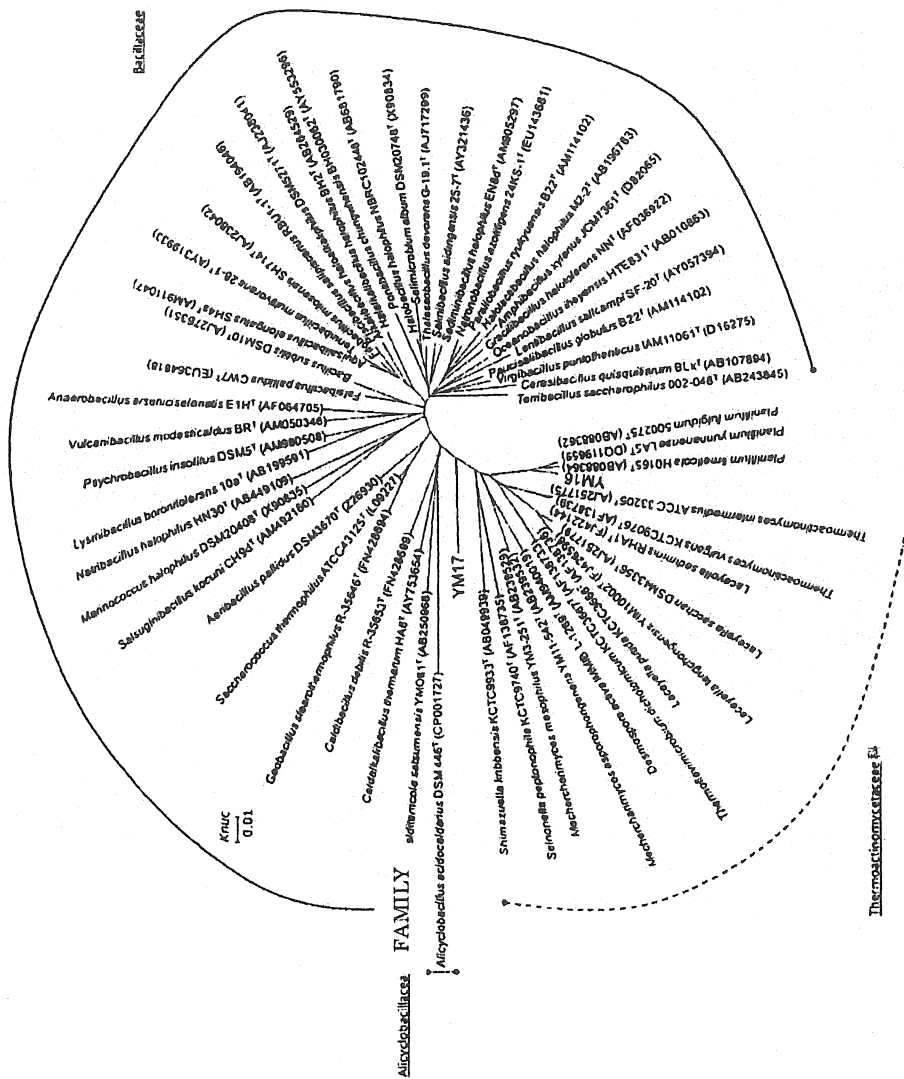


FIG.3

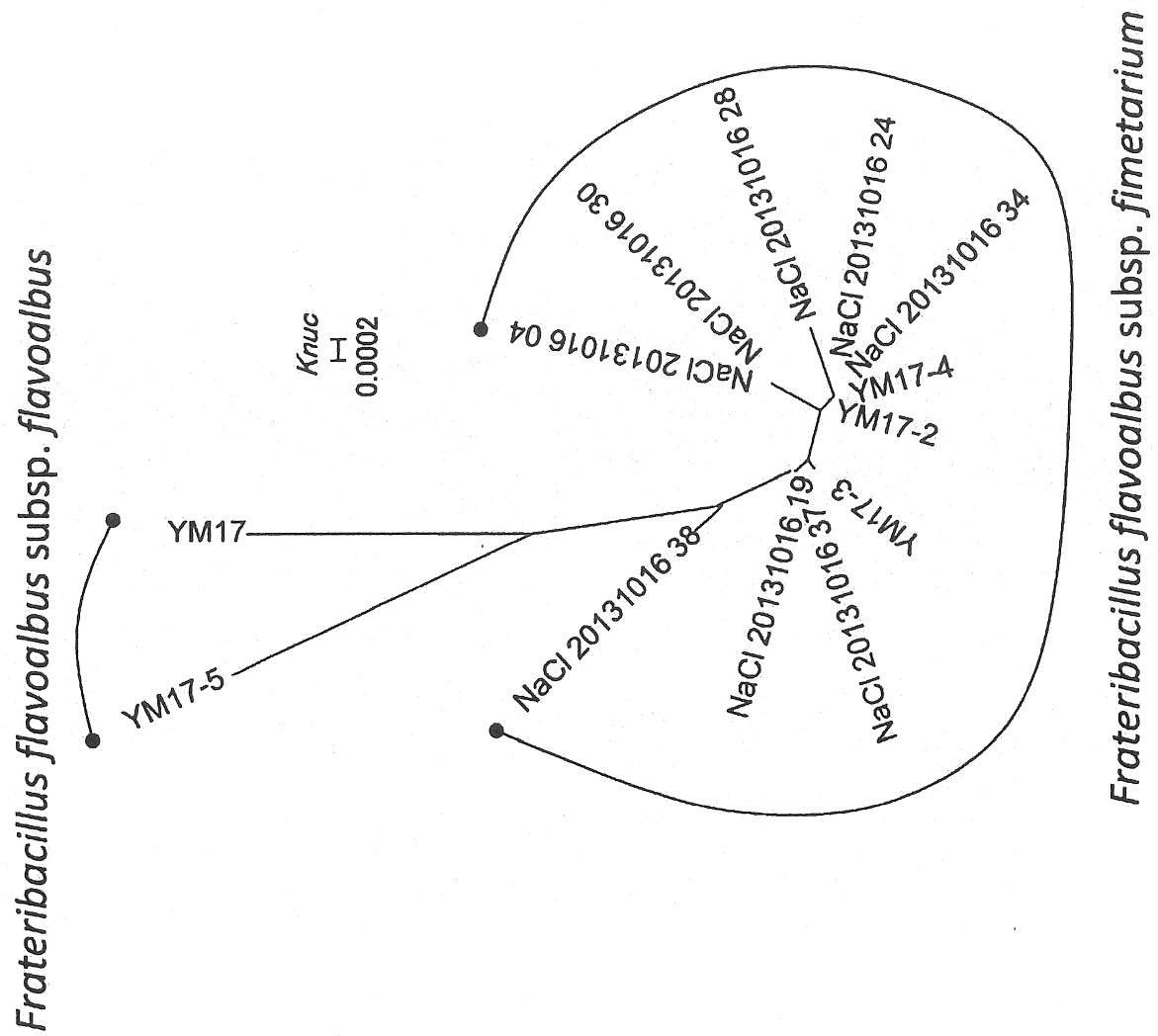
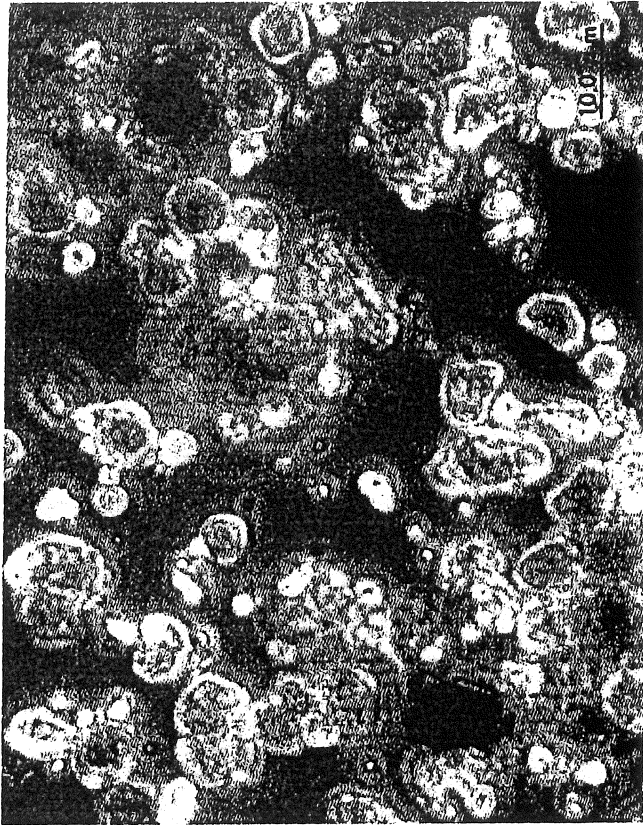
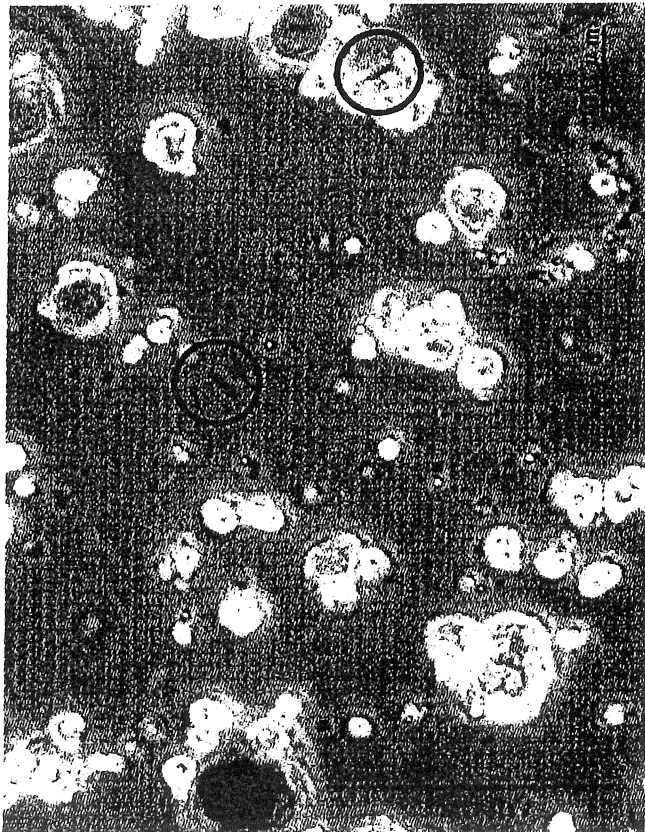


FIG.4



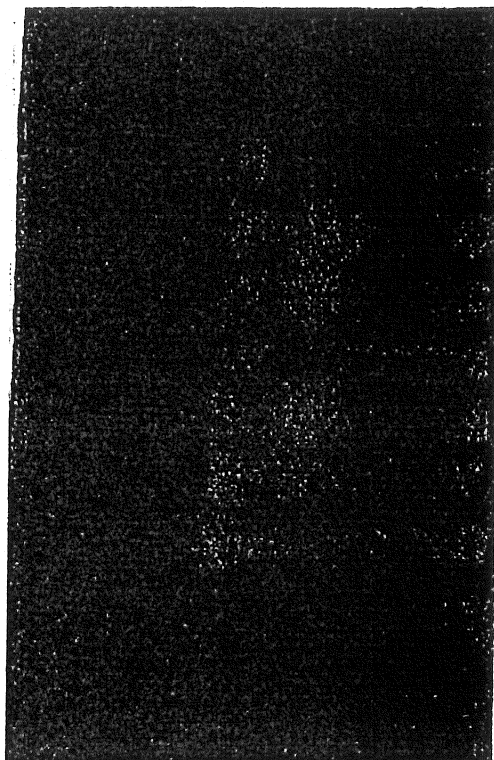
B



A

FIG5

A



Chủng YM17-2

Chủng YM17-3

Chủng YM17-4

Chủng YM17-5

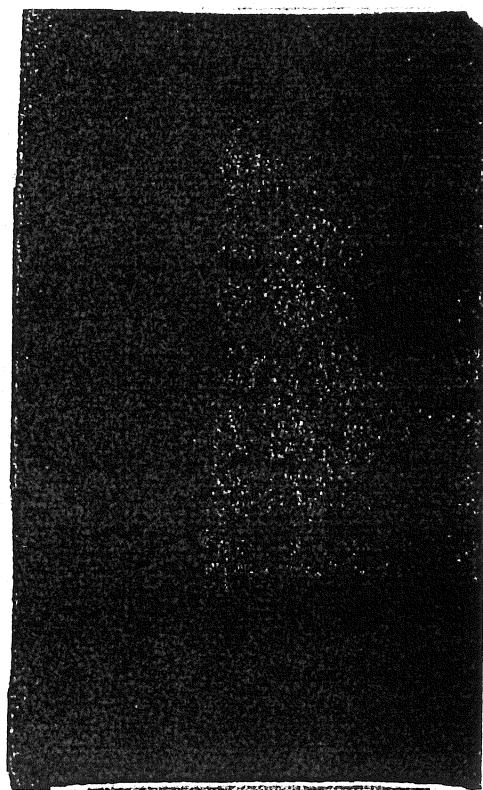
Chủng NaCl_20131016_37

Chủng NaCl_20131016_38

Chủng YM17

Đối chứng âm

B



Chủng YM17-2

Chủng YM17-3

Chủng YM17-4

Chủng YM17-5

Chủng NaCl_20131016_37

Chủng NaCl_20131016_38

Chủng YM17

Đối chứng âm

FIG.6

